

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la
detección de alertas y riesgos sanitarios**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Almudena Cepero Rodríguez

Directores

**Aránzazu Meana Mañes
Mariano Higes Pascual
Raquel Martín Hernández**

Madrid, 2016

MONITORIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS DE LAS ABEJAS PARA LA DETECCIÓN DE ALERTAS Y RIESGOS SANITARIOS



ALMUDENA CEPERO RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**MONITORIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES
PATÓGENOS DE LAS ABEJAS PARA LA DETECCIÓN
DE ALERTAS Y RIESGOS SANITARIOS**

TESIS DOCTORAL

Almudena Cepero Rodríguez

Madrid 2016

El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en el Centro Agrario Regional de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (CAR) y el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de los Doctores Mariano Higes Pascual, Raquel Martín- Hernández y Aránzazu Meana Mañes, como parte de los proyectos RTA-2008-00020-C02-01 (INIA-FEDER), PAI09-0022-1264 (JCCM-FEDER) y API 2013 (MAGRAMA-FEADER). Así mismo, la autora ha disfrutado de una beca predoctoral otorgada por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, al amparo de la Orden del 5 de Mayo de 2009. Durante el desarrollo de la misma se ha realizado una estancia en la Universidad Complutense de Madrid.

ARÁNZAZU MEANA MAÑES, MARIANO HIGES PASCUAL y RAQUEL MARTÍN-HERNÁNDEZ, doctores en Veterinaria,

Informan:

Que Almudena Cepero Rodríguez, licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “MONITORIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS DE LAS ABEJAS PARA LA DETECCIÓN DE ALERTAS Y RIESGOS SANITARIOS”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento, cuatro artículos en tres revistas del Science Citation Index: *BMC Research Notes*, *Parasitology Research* y *Journal of Apicultural Research*. Que, durante la realización de este trabajo, se han presentado cuatro posters y cuatro comunicaciones orales a congresos nacionales e internacionales.

De lo que informamos en Madrid, a 26 de Octubre de 2015.

Fdo. Aránzazu Meana Mañes
Profesora Titular de la UCM

Fdo. Mariano Higes Pascual
Asesor Investigación del CAR

Raquel Martín-Hernández
Investigadora del CAR

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”

Aristóteles

A mi abuela, Micaela
A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos cinco años han sido muchas las personas que han intervenido para elaborar este trabajo, tanto enseñándome como ayudándome, y a su vez han contribuido en mi desarrollo personal.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis tres tutores, Mariano, Raquel y Aránzazu, la confianza depositada en mí, así como sus enseñanzas y la oportunidad de entrar a formar parte de su equipo de trabajo. Desde el primer momento, habéis guiado mis pasos en un mundo tan desconocido para mí como era la apicultura, ya que sin vuestro apoyo no habría sido posible alcanzar esta meta. Mariano, gracias a tu entusiasmo y al esmero con que afrontas cada proyecto, has conseguido despertar en mí un gran interés por la apicultura, y en especial, por investigar las amenazas que puedan poner en peligro la supervivencia de estos bichitos tan especiales. Raquel, tu paciencia y apoyo incondicional me han acompañado a lo largo de estos años, sobre todo en aquellos momentos en los que las cosas no salían tan bien como esperábamos, aportando siempre ideas y fuerzas para afrontar cualquier problema. Aránzazu, a pesar de mi torpeza, has orientado mis pasos en uno de los momentos más cruciales de mi carrera científica, como es escribir una tesis, cuando todo se ve difícil y lejano. Tu constancia y tus consejos me han ayudado a madurar, tanto como persona, como en el ámbito científico.

También quiero agradecer a todos aquellos investigadores que han colaborado para hacer posible este estudio, y son: Lourdes Prieto por enseñarme a utilizar las herramientas de la biología molecular de una manera fácil y divertida; a Carolina Bartolomé por ayudarme a descifrar los secretos de la genética a la hora de establecer relaciones filogenéticas; a Pilar de la Rúa y sus incansables becarias, Irene Muñoz y Laura Jara, con quienes he tenido el placer de trabajar mano a mano y por esos encuentros tan agradables en los congresos; a Amparo Martínez por su importante labor a la hora de procesar tablas inmensas de datos, transformándolos en mapas preciosos, así como a Ricardo García por su paciencia para explicarme algunos detalles estadísticos; a los belgas, Dirk De Graaf y Jorgen Ravoet por aportar sus conocimientos sobre Tripanosomátidos; al equipo compuesto por José Luis Bernal y María José Del Nozal a quienes les debo el análisis de los plaguicidas en polen; al equipo formado por Karina Antúnez y sus becarias (Matilde y Belén) por sus conocimientos sobre los virus de las abejas; al doctor Antonio Nanetti, quien me enseñó el arte de diseccionar una minúscula abeja con toda la paciencia del mundo y el intercambio de impresiones con Ricardo, su becario más reciente.

Gracias a la Junta de Castilla La-Mancha por brindarme la oportunidad de realizar semejante trabajo, así como a la Delegación de Agricultura que me contrató y al INIA que aportó fondos para terminar el procesamiento de las muestras. Así mismo fue

de gran importancia la contribución financiera de entidades como el MAGRAMA, Fondos FEDER, Consejería de Educación de la JCCM y el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria (UCM).

Me gustaría agradecer al Grupo COLOSS su papel en la protección de las abejas, ya que la colaboración internacional, incluida la nuestra, les está ofreciendo datos para poder estudiar el problema de la pérdida de colonias de abejas a nivel mundial.

Debo agradecer en gran medida el apoyo y el esfuerzo de mis compañeros de laboratorio con quienes he pasado muy buenos ratos: M^a Carmen Rogerío, Virginia Albendea, Carmen Abascal y Teresa Corrales, vosotras me recibisteis con los brazos abiertos y me enseñásteis cómo procesar correctamente las innumebables muestras que llegaron al laboratorio. Vuestro buen humor permanente hizo que este trabajo fuera más fácil y agradable. En especial quiero destacar a M^a Carmen por su eterna curiosidad por aprender nuevas técnicas y a Virginia por ayudarme a ordenar toda la información recogida en inmensas bases de datos. María Gajero y Carmen Uceta, a pesar de incorporaros más tarde, vuestro trabajo ha sido realmente importante para procesar las últimas muestras. Javier Almagro y Jesús García, quiero agradecer vuestra ayuda en la tediosa tarea de etiquetar todo el material de muestreo y por enseñarme cómo trabajan las abejas en el campo, además de esas fotos tan estupendas que les robais en vuestras visitas a los colmenares. También tengo mucho que agradecer a mis compis de despacho: empezando por Cristina Botías, Encarnación Garrido, Ana Rosa Quintana, Virginia León, después a Tamara Gómez y Cristina Rodríguez que sustituyeron a las primeras. Entre todas ellas me gustaría destacar a Cristina y Encarna, quienes me enseñaron a manejar las distintas técnicas de laboratorio y cómo hacer bien las cosas desde el principio, sobre todo a Encarna porque su tesis ha sido como una biblia para mí. Por otro lado, tengo mucho que agradecer a Soledad y Tamara ya que ellas me enseñaron a descifrar miles de secuencias genéticas e incluso a emplear la fuerza bruta para poder extraer las bandas de un gel.

Me gustaría mencionar a todos los demás compañeros del CAR para agradecerles el cariño con el que siempre me han acogido desde el primer día: a Fernando Viana por sus palabras de ánimo, Andrés, Óscar y Antoñito por alegrarme las mañanas al recibirme siempre con una sonrisa, Aitor por ser una máquina resolviendo todas mis dudas informáticas y administrativas, Fede que también me ayudó con la informática cuando los ordenadores se negaban a colaborar, José Luis siempre tan servicial, los compañeros del laboratorio de mieles (Susana, Alberto y Raquel) por sacarme del centro para disfrutar de los riquísimos torreznos del Ortega, a las compañeras del pecuario (Inma, Isabel y Arancha), a los hombres de azul (especialmente Paco, Pedro, Miguel y Jesús) y a todos los conductores que madrugaron para llevarme cada día al CAR.

Agradezco a Ángel Sanz y José Alberto Viñuelas por la ayuda prestada y su confianza en mí, hasta para invitarme a participar en las conferencias de la Feria Apícola de Pastrana.

Es necesario agradecer a todas aquellas personas que durante su estancia en el CAR me echaron una mano en el procesado de las muestras: M^a Luz Pascual, Tamas Csáki, María Benito, Diego Dias, Alejandro Bohórquez y Claudia Dussaubat. Sobre todo agradecer a todas las asociaciones, apicultores y veterinarios que donando sus abejas, cría y demás hicieron posibles los muestreos para recopilar los datos que utilizamos para establecer prevalencias que nos sirvan para evaluar el estado de salud de las abejas.

A mis amigos de la UAH, que siempre me habeis apoyado y siempre estabais ahí para desconectar y recargar pilas. Sobre todo a aquellos amigos que han tenido que dejarlo todo porque este país no les da una oportunidad, son los que más aprecio y admiro. Y a mis profes del Departamento de Zoología, en especial José Manuel Vieitez y Pedro Corrales, con quienes descubrí lo fascinante de la vida de los microartrópodos ; además de Jorge Pérez y Javier, del Departamento de Parasitología, quienes me introdujeron en el curioso mundo de los parásitos.

En la última fase de este trabajo debo agradecer a los compañeros del Departamento de Sanidad (Miguel, Julia, Rocío, Ana, Rosa, Valentina y Oihane) su buena acogida durante mi estancia en la UCM, donde me cuidaron como a una reina. Destacando a Miguel, por su complicidad y por compartir sus fotos conmigo, y a Julia por saber elegir la música correcta para cada ocasión. Además me gustaria felicitar al equipo de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria, Mar y Carmen Muñoz, siempre tan amables y dispuestas a ayudar, por enseñarme a realizar búsquedas bibliográficas eficaces en las bases de datos (amenizando sus explicaciones con caramelos) y darme a conocer las distintas herramientas de las que disponemos para facilitar el trabajo que supone hacer una tesis doctoral.

Por último, aunque no por eso menos importante, a mi familia. Empezando por mis padres, que con sus constantes palabras de ánimo consiguieron que nunca perdiera las fuerzas para alcanzar esta meta , a mi abuela siempre preocupada por la desaparición de las abejas, a mis hermanos sobre todo al pequeño de la casa por su apoyo informático las 24h del día, y a mi pareja por sus muestras de cariño y su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, juntos hicieron este trabajo más llevadero.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. Apicultura: Cabaña apícola española	9
1.1. Historia de la apicultura	9
1.2. Sistemas de explotación	10
1.3. Importancia económica	12
1.4. Normativa. Legislación	14
2. <i>Apis mellifera iberiensis</i>	16
2.1. Origen	16
2.2. Ciclo biológico e individuos de la colonia	19
2.3. Anatomía y fisiología	22
2.4. Biología de la colonia	25
3. Clasificación bioclimática de España	27
4. Agentes nosógenos de la abeja melífera	28
4.1. Agentes nosógenos bióticos: Patógenos	30
4.1.1. Varroosis (agente <i>Varroa destructor</i>)	32
4.1.2. Acarapisosis (agente <i>Acarapis woodi</i>)	44
4.1.3. Nosemosis (agente <i>Nosema apis</i> y <i>N. ceranae</i>)	52
4.1.4. Infección por neogregarinos	62
4.1.5. Infección por tripanosomátidos	63
4.1.6. Ascosferosis (agente <i>Ascosphaera apis</i>)	65
4.1.7. Loque americana (agente <i>Paenibacillus larvae</i>)	74
4.1.8. Loque europea (agente <i>Melissococcus plutonius</i>)	85
4.1.9. Virus que afectan a las abejas	94
4.1.10. Aethinosis (agente <i>Aethina tumida</i>)	100
4.2. Agentes nosógenos abióticos: Plaguicidas	106
MATERIAL Y MÉTODOS	111
5. VIGILANCIA ACTIVA: muestreos sistemáticos	113
5.1. Diseño de la vigilancia activa	113
5.1.1. Cálculo muestral	113
5.1.2. Tipo de muestra y material para recogida	113
5.1.3. Toma de muestras	114
5.1.4. Recepción y registro de las muestras	115
5.1.5. Clasificación bioclimática de las muestras	115
5.2. Encuesta epidemiológica	115
5.3. Detección de patógenos	116
5.3.1. Examen macroscópico	116
5.3.2. Diagnóstico molecular	118
5.4. Detección físico-química de plaguicidas en polen	134

5.5. Análisis estadístico de los datos	134
6. VIGILANCIA PASIVA: muestras de casos clínicos	135
6.1. Obtención de datos y tipo de muestra.....	135
6.2. Recepción y organización de las muestras.....	136
6.3. Procesado de las muestras.....	136
6.4. Detección de patógenos.....	136
6.5. Análisis estadístico de los datos	137
RESULTADOS	139
7. Capítulo 1: VIGILANCIA ACTIVA	141
7.1. Material de muestreo.....	141
7.2. Encuesta epidemiológica.....	144
7.2.1. Cuestiones zootécnicas.....	144
7.2.2. Cuestionario sobre pérdida de colmenas y despoblamiento	145
7.2.3. Tratamientos realizados frente a <i>Varroa destructor</i>	147
7.3. Detección de agentes nosógenos.....	151
7.3.1. Detección de patógenos	151
7.3.1.1. Examen macroscópico	151
7.3.1.1.1. <i>Varroa destructor</i>	151
7.3.1.1.2. Otros ectoparásitos	154
7.3.1.2. Diagnóstico molecular	154
7.3.1.2.1. <i>Acarapis woodi</i>	154
7.3.1.2.2. Género <i>Nosema</i>	160
7.3.1.2.3. Neogregarinos.....	163
7.3.1.2.4. Tripanosomátidos	165
7.3.1.2.5. <i>Ascosphaera apis</i>	170
7.3.1.2.6. <i>Paenibacillus larvae</i>	171
7.3.1.2.7. <i>Melissococcus plutonius</i>	173
7.3.1.2.8. Virus en las abejas adultas.....	174
7.3.1.2.9. <i>Aethina tumida</i>	182
7.3.1.3. Asociación de patógenos	182
7.3.1.4. Análisis patógenos/mortalidad de colonias.....	183
7.3.2. Detección de plaguicidas	186
8. Capítulo 2: VIGILANCIA PASIVA	188
8.1. Tamaño muestral	188
8.2. Motivos de remisión de muestras.....	188
8.3. Prevalencias de los patógenos analizados	190
DISCUSIÓN	191
9. VIGILANCIA ACTIVA	194
10. VIGILANCIA PASIVA.....	217

CONCLUSIONES	219
RESUMEN	223
SUMMARY	229
BIBLIOGRAFÍA.....	235
ANEXO I (Encuesta 2010)	299
ANEXO II (Encuesta 2011)	303
ANEXO III (Cepero y col., 2014a)	307
ANEXO IV (Cepero y col., 2014b)	319
ANEXO V (Cepero y col., 2015a)	325
ANEXO VI (Cepero y col., 2015b)	335

INTRODUCCIÓN



La apicultura es una actividad ancestral y muy arraigada en nuestra cultura, como demuestran las pinturas rupestres del período Paleolítico (7.500 años) encontradas en la Cueva de la Araña (Valencia) que recogen escenas de la recolección de la miel. Esta actividad consiste en la cría y manejo de las abejas para el aprovechamiento de los productos derivados de la colmena, tales como miel, polen, cera, jalea real, propóleos y veneno (apitoxina). Productos todos muy apreciados y beneficiosos para el hombre, así como utilizados en la industria farmacéutica.

El papel de las abejas es fundamental en la conservación del medio ambiente y en la polinización de cultivos, aunque a la abeja melífera (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) se le conoce principalmente por su capacidad de elaborar miel. Desde el Mesolítico hasta nuestros días la miel es el producto derivado de la apicultura más apreciado para el hombre. Tiene un cierto impacto económico en nuestro país ya que España es el país europeo situado en cabeza cuando se habla de producción de miel (29.406 Tm, datos de MAGRAMA 2012), aun cuando solo representa un porcentaje muy bajo en comparación a otras producciones (0,44% de la Producción Final Ganadera y el 0,17% de la Producción Final Agraria). En cambio la producción de cera y polen representa valores inferiores (1.539.041 y 1.063.500 Tm, respectivamente, datos de MAGRAMA 2013). A nivel de comercio externo España es el segundo país exportador de miel dentro de la Unión Europea después de Alemania. Nuestro país en cuanto al censo de colmenas, supera los dos millones y medio de colmenas (1/05/14 REGA), siendo Andalucía y Extremadura las Comunidades Autónomas con mayor número de colonias. Respecto al número de apicultores, se ha visto aumentado en un 8,1% desde el año 2008. Cabe destacar que el 80% de las colmenas registradas del censo español pertenecen a apicultores profesionales. En relación a la clasificación zootécnica de las explotaciones, según datos proporcionados por el Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA), un 64% de los apicultores se dedica a la producción de distintos productos apícolas como la miel, el polen o la cera; mientras que, un bajo porcentaje se dedican a la polinización (1,39 %) de diversos cultivos de interés agrícola y a la selección y cría de reinas (0,17 %).

Todo esto convierte a España en una gran potencia mundial en lo que a apicultura se refiere, ocupando el octavo puesto como productor de miel dentro de la Unión Europea.

En la actualidad, existen numerosas amenazas que afectan a las abejas melíferas en todo el mundo. En particular, el fenómeno conocido con el nombre de “Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas” (SDC) ha sido objeto de muchas investigaciones en los últimos años. Este síndrome está caracterizado por una disminución drástica del número de abejas de las colonias sin causa aparente,

provocando el debilitamiento de las colonias hasta alejarlas de su estado productivo óptimo, e incluso causar su muerte. Se han discutido varias hipótesis a cerca de las causas que podrían provocar este fenómeno.

En primer lugar, el descenso en el número de abejas podría estar influenciado por el uso incorrecto e indiscriminado de los plaguicidas, principalmente del tipo insecticida, utilizados para el control de plagas en agricultura y aquellos acaricidas aplicados en los tratamientos contra el ácaro *Varroa destructor*, pudiendo provocar daños o intoxicaciones en las abejas pecoreadoras debido a la exposición crónica a estas sustancias.

En segundo lugar, se considera que los patógenos podrían jugar un papel primordial en el incremento de mortalidad de las abejas. Uno de los agentes que intervienen en la pérdida de colonias es el ácaro *Varroa destructor*. Es un parásito de las abejas adultas y sus crías, el cual se caracteriza por succionar la hemolinfa de estos insectos debilitando la colmena y actuando a su vez como vector implicado en la transmisión de otros agentes patógenos como los virus; por ello, la varroosis constituye en la actualidad uno de los principales problemas de los apicultores europeos. Sin embargo, también destaca la reciente introducción de *Nosema ceranae* como una posible causa responsable de la mortalidad de las abejas. Este agente es originario de Asia y se trata de un hongo unicelular, perteneciente al grupo de los microsporidios, el cual a través de sus esporas deteriora el tejido ventricular de la abeja provocando pocos signos de su infección, pasando desapercibida mientras mueren y desaparecen las abejas infectadas hasta que tras un largo período de infección la colonia desaparece.

En consecuencia con esta situación, el Centro Apícola Regional (CAR) de Marchamalo, en colaboración con el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid, han realizado diversos estudios en los últimos años para conocer los principales patógenos que afectan a las abejas melíferas. La mayoría de los trabajos realizados entre los años 1992 y 2004 se centraron en la mejora del control de la varroosis. Desde el año 2005 todos los proyectos se enfocaron en el estudio del despoblamiento y, de forma asociada, del microsporidio *Nosema ceranae*. Cabe destacar la importancia de los datos obtenidos mediante un estudio epidemiológico realizado durante los años 2006 y 2007, en los que se estableció la prevalencia de los principales patógenos que afectan a las abejas melíferas dentro de los cuales destacaban *Varroa destructor* y *Nosema ceranae* como los patógenos más prevalentes. Este conjunto de conocimientos han sido adquiridos gracias a la financiación aportada por diferentes instituciones como la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) a través de los años para llevar a cabo investigaciones en los temas más

prioritarios de este tipo de ganadería. Por lo tanto, el estado sanitario de esta ganadería es crucial, ya que los problemas sanitarios podrían provocar consecuencias muy negativas para este sector. Por todo ello, resulta imprescindible establecer medidas de control de las enfermedades de las abejas, basados en la implantación de sistemas de vigilancia de los factores que afectan la salud de las abejas con el fin de conocer el estado sanitario de las colonias de abejas. Razón por la cual, en este estudio epidemiológico, se ha desarrollado un sistema de monitorización de los agentes nosógenos capaces de alterar la salud de las colonias de abejas, compuesto por dos tipos de vigilancia (activa y pasiva) para llevar a cabo los siguientes objetivos:

1. Realizar una evaluación de los riesgos sanitarios a los que están sometidas las abejas, a través de:
 - El estudio de la prevalencia de los principales patógenos de las abejas
 - El análisis de plaguicidas, presentes en muestras de polen, para conocer los niveles de contaminación ambiental
2. Desarrollar programas de monitorización para detectar de forma rápida y eficaz la aparición de agentes exóticos y prevenir su dispersión por el territorio español.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1. Apicultura: Cabaña apícola española

1.1. Historia de la apicultura

Etimológicamente apicultura proviene de los términos del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo), y según la Real Academia de la Lengua Española se define como el “arte de criar abejas para aprovechar sus productos”. Para Pierre Jean-Prost (1989), ingeniero agrónomo y apasionado por la apicultura, la apicultura es “la ciencia de la cría y mantenimiento de las abejas con vistas a obtener de su trabajo dirigido, miel, cera, polen y jalea real como principales productos del colmenar”. A todo ello se suma el beneficio producido por la actividad apícola en la agricultura y diversidad vegetal, producto de la función polinizadora que realizan estos insectos sobre las plantas cultivadas y silvestres, mientras realizan las labores de pecoreo o búsqueda de alimento.

La primera evidencia que confirma la relación entre el hombre y la abeja en España se remonta al paleolítico, como demuestran las pinturas rupestres de la Cueva de la Araña localizadas en la Comunidad Valenciana (Bicorp), donde se observa una figura humana recogiendo miel de panales silvestres para su alimentación. La abundancia de este producto, unida a sus innumerables propiedades, lo convirtieron en una fuente de recursos alimenticios fundamental en el mundo mediterráneo.

El hallazgo de papiros que datan del año 2400 a.C. evidencia la realización de prácticas apícolas durante el período predinástico de Egipto. En ellas, se puede ver a los egipcios trasladando colmenas por medio de embarcaciones a través del Nilo. Ellos fueron los primeros en fabricar colmenas de arcilla en forma tubular para explotar los enjambres de manera artificial. Una serie de figuras y gráficos encontrados en las tumbas de varios faraones manifiestan el uso del humo y la práctica de la extracción de la miel y la cera sin necesidad de recurrir al apicidio o matanza de la colonia completa. Durante este período el valor de la miel se incrementa debido a su uso con fines medicinales.

En la Grecia Antigua, Aristóteles describe en el libro V de su obra *Historia Animalium* la libación del néctar, la organización de los nidos de las abejas y su estructura social, y comenta también el empleo de algo similar a un panal móvil fabricado con listones para guiar las construcciones de cera de las abejas.

En el período romano, la miel era muy valorada y muchos autores como Virgilio, Plinio y Varrón dedicaron obras muy interesantes sobre la descripción de los hábitos y la cría de las abejas, incluida la obra *De re rustica* del español Columela, que establece conceptos y procedimientos que hoy en día permanecen vigentes. Otro tratado posterior del árabe Adú Zacarías (Tratado de Agricultura) también hizo referencia al manejo de las colmenas. La mejora de las técnicas permitió producir

buenas cosechas de miel, y potenció la aparición de nuevas aplicaciones como la conservación de frutas, la producción de bebidas alcohólicas como el hidromiel, la elaboración de aceites aromáticos y el tratamiento de heridas o envenenamientos.

Según comenta Sepúlveda (1980), tras la decadencia del Imperio Romano, y pese a que el rey Alfonso X el Sabio en el siglo XIII estableció las *Ordenanzas de Colmeneros*, con el fin de organizar las prácticas apícolas, la actividad apícola sufrió una decadencia que se incrementó en el siglo XVI con el descubrimiento del azúcar de caña primero y el de la remolacha más tarde (Voorhies y col., 1933). A pesar de la competencia de la miel con los nuevos edulcorantes, la apicultura se mantuvo en algunos conventos debido a sus aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, culinarias y nutritivas de la miel.

Tal y como indica Cobb (2000, 2002) en sus escritos, la apicultura volvió a resurgir gracias a los hallazgos de Luís Méndez de Torres en el año 1586, que fue el primero en considerar a la abeja reina como la hembra encargada de la puesta de los huevos. A este acierto se sumaron, ya en el siglo XVII, los descubrimientos de Jan Swammerdam acerca de la anatomía y el crecimiento de las larvas y las ninfas, el aporte de jalea real a las larvas de la reina, así como la metamorfosis y muda de las larvas y la organización de la colonia. Esta serie de revelaciones supuso un aumento en el conocimiento biológico de los insectos tanto a nivel individual como colonial que condujo a numerosos avances técnicos, en los siglos sucesivos, como el desarrollo de los panales móviles por Lorenzo Langstroth en 1851, los moldes para láminas de cera por Johannes Mehring en 1857, un rudimentario aparato para extraer la miel por Von Hruschha en 1865, el primer ahumador por Moses Quimby en 1870 y la colmena tipo Layens por Georges de Layens en 1874.

Todos estos progresos contribuyeron a la transformación de una apicultura tradicional en una apicultura técnica, la cual hoy en día está considerada como una actividad zootécnica.

1.2. Sistemas de explotación

En la actualidad existen dos tipos de apicultura. Por un lado, la apicultura sedentaria o estante, en la cual la ubicación de la colmena no varía y requiere alimentación artificial en algunas épocas del año. Y, por otro lado, la apicultura trashumante, que consiste en trasladar geográficamente las colmenas con el fin de aumentar la producción.

En ambos casos la colmena constituye el medio de explotación de la apicultura moderna y se define como el soporte material donde vive una colonia de abejas, el cual puede tratarse de una cavidad natural o haber sido fabricada por el hombre.

Las colmenas rústicas son aquellas que no tienen intervención del ser humano, como un hueco en el interior de un árbol, o que han sido construidas sin mayor sofisticación. Antiguamente se fabricaban con materiales como barro cocido, corteza de alcornoque y mimbre o paja trenzada, que eran cubiertas con tejas, tablas o ladrillos, para protegerlas de las condiciones meteorológicas. La mayor desventaja de este tipo de colmenas era la necesidad de exterminar las colonias de abejas completas o en parte para recolectar la miel.

La construcción de las colmenas se ha perfeccionado a lo largo de los años para optimizar la producción de miel y mejorar las condiciones de vida de las abejas. En la actualidad se distinguen dos tipos de colmenas (RD 209/2002): fijistas o de panales fijos, en las cuales los panales de cera son fabricados por las abejas y aparecen adheridos fuertemente a las paredes y al techo del recipiente que las contiene (troncos huecos de árboles, cestos mimbre, campanas de paja etc.); y movilistas o de panales móviles, que son las más utilizadas en la apicultura moderna, y poseen unos cuadros móviles de madera sobre los que se sitúan los panales formados por láminas de cera estampada y que permiten su separación de la colmena tanto para la recolección de la miel como para la limpieza o aplicación de tratamientos sin necesidad de destruir el nido de cría. Se han desarrollado numerosos tipos de colmenas movilistas de diversos tamaños y alturas, aunque únicamente se nombrarán las más frecuentes atendiendo a la forma de crecimiento de la colonia: verticales, horizontales y de reproducción.

Las colmenas de crecimiento horizontal presentan una capacidad de crecimiento limitada, ya que no permite que se añadan alzas. Están construidas por un único cajón y a medida que va aumentando la población de abejas, la cantidad de miel también se incrementa y va ocupando los panales secuencialmente de forma horizontal. La facilidad para cerrarlas y la posibilidad de que un mismo habitáculo desempeñe labores de cámara de cría y de alza melaria, proporciona una gran ventaja para su manejo en trashumancia, pero presenta el inconveniente de impedir el crecimiento de la colonia. La colmena más utilizada se denomina Layens, gracias al nombre de su inventor, Georges de Layens.

La colmena de tipo vertical presenta una capacidad ilimitada del crecimiento de la colonia, ya que a medida que la población de abejas va creciendo, pueden ser ampliadas añadiendo tantas alzas de miel como sean necesarias y dejando la cámara de cría por debajo. Hay varios tipos de colmenas verticales como la colmena Dadant o industrial, Lusitana, Smith... pero la más extendida es la colmena Langstroth o perfección, que fue patentada por Lorenzo Langstroth.

Las colmenas de reproducción se conocen con el nombre de núcleos, en general son más pequeñas y sirven para criar una nueva colmena a partir de una reina y algunas abejas, por ello constan de menos cuadros en su interior (entre dos y cinco).

Independientemente del tipo que sean, las colmenas agrupadas en un mismo emplazamiento forman un colmenar o apiario. Cada apicultor colocará sus colmenas en uno o varios colmenares, con independencia de su finalidad dando lugar a explotaciones apícolas que pueden ser profesionales (≥ 150 colmenas), no profesionales (16 - 149 colmenas) o de autoconsumo (0-15), en función del número de colmenas (RD 209/2002).

Durante la Edad Media era frecuente encontrar un tipo de colmena muy particular en España, denominados hornos de abejas. Son construcciones de gran tamaño de adobe y tejas, que se encuentran divididas en dos zonas: una parte sirve para almacenar el material apícola y la otra está formada por varios compartimentos independientes que contienen las colmenas para las distintas colonias de abejas. El apicultor accede a las colmenas desde la zona común para recolectar la miel de los panales, mientras que hacia el exterior se abre una ranura o piquera para el paso de las abejas en cada colmena. En la actualidad, este tipo de colmena está desapareciendo, pero aún quedan algunos hornos en el sur de Aragón y en la zona de Molina de Aragón (Guadalajara).

1.3. Importancia económica

Desde hace mucho tiempo España ha mostrado una gran tradición apícola, quedando reflejado en las numerosas referencias a la miel o las abejas que se pueden encontrar en diversas regiones del país (Colmenar, Colmenarejo, Muchamiel, etc) o en algunos accidentes geográficos (el Pico de la Miel...), así como la conocida tradición de algunas comarcas que dan su nombre a la miel (Miel de la Alcarria). Las excelentes condiciones climáticas y orográficas de España, unidas a una rica y diversa flora melífera, han impulsado el desarrollo de la apicultura, debido a que no se necesitan grandes inversiones para conseguir un producto final de alta calidad. Por este motivo, la apicultura normalmente ha sido considerada como una actividad complementaria de las explotaciones agropecuarias. En cambio, los nuevos apicultores están rompiendo estos conceptos mediante la incorporación de las nuevas aportaciones tecnológicas para dar paso a explotaciones más modernas que industrializan la producción.

En 2007, se registró la existencia de un total de 72,6 millones de colmenas de abejas a nivel mundial (FAOSTAT, 2009), lo que implica un aumento del 64% en el número total de colonias manejadas desde el año 1961. En cambio, este incremento no fue homogéneo en todas las regiones. Entre los años 1961 y 2007, el número de colmenas descendió tanto en Europa (-26,5%) como en Norteamérica (-49,5%), mientras que se elevó en Asia (426%), África (130%), Sudamérica (86%) y Oceanía (39%) (FAOSTAT, 2009).

Esta variación se aprecia perfectamente en el caso de España, donde el censo ha sufrido un crecimiento del 220% en los últimos 30 años, al pasar de 1.102.000 colmenas en 1985 a 2.576.138 en 2014. Este número de colmenas corresponde alrededor del 20% del censo reconocido de la Unión Europea (REGA 01/05/2014).

Este considerable aumento de la cabaña apícola española está asociado con la entrada en vigor en 1998 del Reglamento CE 1221/97, que regula las medidas destinadas a mejorar la producción y comercialización de la miel. La aplicación de este nuevo reglamento incentivó el aumento de apicultores profesionales dedicados exclusivamente a la apicultura, y actualmente el grado de profesionalidad del sector es del 18,8%. Estos apicultores se concentran a día de hoy en las comunidades de Andalucía, Extremadura y Valencia. De las 25.898 explotaciones apícolas registradas de manera oficial en el Registro de Explotaciones ganaderas (REGA) en España, alrededor del 37% son explotaciones apícolas trashumantes (MAGRAMA 2014).

El modelo de apicultura seguido en España está muy influenciado por la diferencia climática entre norte y sur. En las comunidades autónomas situadas más al norte, como Castilla y León, País Vasco y Galicia, el tipo de colmena más utilizado es movilista tipo Langstron, Dadant y/o Perfección, ubicadas en pequeños colmenares, normalmente pertenecientes a apicultores no profesionales. Mientras que en las comunidades de ambiente más cálido, como Andalucía, Extremadura y/o Comunidad Valenciana, los apicultores son profesionales y manejan un mayor número de colmenas, tipo Layens fundamentalmente, que son más manejables y les permiten realizar movimientos trashumantes (REGA 01/05/2014).

En cuanto a la clasificación zootécnica de las explotaciones, un 64% se dedica a la producción de productos apícolas (miel, polen, cera) producciones que se obtienen de la colmena. Además de su papel polinizador, las abejas juegan un papel crucial como productoras de miel con una importancia relevante en los países de Europa con un clima mediterráneo y en otros, como por ejemplo Argentina y Brasil, siendo éstos unos de los principales productores de miel a nivel mundial. En estas zonas la pérdida de colonias de abejas supone un descenso en la producción de miel por parte de los apicultores profesionales, destacando dentro de Europa España como uno de los países más afectados por ser el principal productor europeo de miel. Habiéndose registrado un valor de 32.860 (estimación) toneladas en el año 2013, nuestro país se ha convertido en el segundo exportador de miel entre los países comunitarios (Datos MAGRAMA 2014). En el año 2012, se produjeron 1.535 toneladas de cera, donde destacan las comunidades autónomas de Extremadura, Valencia y Andalucía (MAGRAMA 2012); mientras que la producción de polen supera las mil toneladas, no pudiendo ser comparada con la producción de otros países por carecer de datos fiables. En los últimos años la jalea real, los propóleos y los venenos de abeja han

adquirido una mayor demanda en el mercado. Sin embargo, un bajo porcentaje se dedican a la polinización (1,39%) y a la selección y cría de reinas (0,17%).

Aunque en España los servicios de polinización no son muy demandados, en los Estados Unidos la polinización adquiere un importante valor económico (Morse y Calderone, 2000). De hecho, la contribución más importante que las abejas melíferas hacen a la agricultura es el servicio de polinización que proporcionan (VanEngelsdorp y Meixner, 2010), ya que la producción del 80% de las 264 especies cultivadas en la UE dependen de la polinización de los insectos (Klein y col., 2007; Chauzat y col., 2013). Para otros autores (Klein y col., 2007), la desaparición de las colonias de abejas conllevaría a una disminución de las cosechas tanto en calidad como en cantidad. Gallai y col. (2009) estimó que el valor económico anual a nivel global de la polinización rondaría los 153 billones de euros, lo que puede suponer el 9,5% del valor total de la producción agrícola (VanEngelsdorp y Meixner, 2010).

Varias especies de aves, murciélagos y otros insectos (escarabajos, mariposas...) también colaboran en la polinización de algunos frutos, pero las abejas melíferas son los polinizadores más competentes para la mayoría de los monocultivos a nivel mundial (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000) debido a su gran distribución y abundancia (Bradbear, 2009). El manejo de las abejas melíferas resulta sencillo para la polinización de grandes plantaciones por varias razones: la gran abundancia de individuos trabajadores por colmena (10.000-40.000 individuos, un tercio de los cuales son pecoreadoras), el aporte de alimentación artificial puede ser utilizado por el apicultor para estimular el crecimiento de las poblaciones orientadas a la polinización, y, por último, su propia biología les permite visitar un amplio rango de tipos de flores.

No obstante, para obtener un máximo rendimiento tanto en las producciones apícolas como en la polinización de cultivos, se debe mantener un buen estado sanitario de las colonias. Por ello, se recomienda la realización de controles sanitarios de forma periódica sobre las poblaciones de abejas.

1.4. Normativa. Legislación

La apicultura en España se regula legalmente por el RD 209/2002 (y su posterior modificación RD 448/2005), que establece los conceptos básicos y las normas de ordenación que deben seguir las explotaciones apícolas. Entre las reglas que deben cumplir, destacan la identificación de las colmenas mediante un código alfanumérico, la localización y señalización del colmenar, y la inscripción de la explotación en su comunidad autónoma correspondiente, que a su vez deben constar en REGA (RD 479/2004). Cada explotación apícola debe poseer un libro de registro, donde aparezcan: el código de la explotación, los datos identificativos del titular de la misma, el número de colmenas que la constituyen, la información de cualquier tipo de

traslado que sufran las colmenas, los datos sanitarios de la explotación y los análisis de laboratorio realizados.

En 1998, con el Reglamento (CE) 1221/97, se instauró en nuestro país el primer Programa Nacional de medidas de Ayuda a la Apicultura financiado en un 50% por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agrícola (FEOGA). El 50% restante fue asumido a partes iguales por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), y las comunidades autónomas (CC.AA.). La aplicación de esta normativa queda establecida en el Reglamento (CE) 2300/97 de la Comisión. Posteriormente, ambas disposiciones fueron derogadas y sustituidas por los Reglamentos (CE) 797/2004 del Consejo y 917/2004 de la Comisión, respectivamente (modificado por el Reglamento (CE) 811/2007 y 726/2010 de la Comisión), pasando los Programas Nacionales Apícolas a ser de periodicidad trianual y a incluir los productos de la apicultura, no sólo la miel. La Decisión de la Comisión de 10 de agosto de 2007 aprueba asimismo la participación comunitaria en la financiación del programa de mejora de la producción y comercialización de los productos de la apicultura en España, en los ejercicios 2008, 2009 y 2010.

En la actualidad, las medidas de apoyo a este sector se fijan mediante el Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo que, desde el 1 de enero de 2008, deroga el Reglamento (CE) 797/2004 y establece las normas generales de aplicación de las medidas destinadas a mejorar la producción y la comercialización de la miel. La ejecución de este Reglamento contempla la posibilidad de establecer programas dirigidos a: la asistencia técnica de los apicultores y de las agrupaciones de apicultores, la lucha contra la varroosis, la racionalización de la trashumancia, la creación de medidas de apoyo a los laboratorios de análisis de las características fisicoquímicas de la miel, el establecimiento de medidas de apoyo a la repoblación de la cabaña apícola comunitaria, y la colaboración con organismos especializados en la realización de programas de investigación aplicada en apicultura.

El sector apícola recibe además una serie de ayudas para su promoción, tales como: la subvención para la mejora de la biodiversidad en zonas frágiles (RD 708/2002), ayudas para el fomento de la apicultura ecológica en el marco de métodos de producción compatibles con la protección del medio ambiente (RD 4/2001), y la concesión de primas para la polinización en disposiciones vigentes en determinadas regiones.

A su vez, los intercambios intracomunitarios de abejas vivas y los modelos de certificación sanitaria están regulados por la Decisión 2007/265/CE, que amplía la Directiva 90/425/CEE, relativa a los controles veterinarios y zootécnicos aplicables en los intercambios intracomunitarios de determinados animales vivos y productos con vistas a la realización del mercado interior. Por otro lado, las importaciones de abejas

(*Apis mellifera*) y abejorros (*Bombus* spp.) procedentes de determinados países terceros deben estar controladas por la policía sanitaria (Decisión 2003/881/CE; Decisión 2005/60/CE; artículo 9 del código de los animales terrestres-OIE 2014).

El control de las enfermedades que afectan a las abejas melíferas está regulado por el RD 526/2014 que sustituye al RD 617/2007 (modificado por la Orden APA/735/2008), que establece varias listas de enfermedades de declaración obligatoria y regula su notificación. Así, se incluye dentro del anexo I (enfermedades de declaración obligatoria en España) patologías como aethinosis y tropilaelapsosis. El resto de enfermedades de declaración obligatoria en la Unión Europea que afectan a las abejas aparecen recogidas en las listas de la OIE (2015), y que añade a las dos anteriores la varroosis, acarapisosis, loque americana y loque europea. Mientras que el RD 608/2006 complementa en el área de la sanidad apícola al RD anterior, ya que contiene un Programa Nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel.

Para que una materia activa pueda ser registrada como medicamento veterinario de uso apícola (Reglamento (CE) 1774/2002) debe tener establecido un límite máximo de residuos (LMR) en la miel de las sustancias farmacológicamente activas utilizadas en el tratamiento de las colonias de abejas (Reglamento (CE) 178/2006, Reglamento (CE) 839/2008, Reglamento (CE) 256/2009, Reglamento (CE) 459/2010), los mismos requerimientos de seguridad se aplicarían para los plaguicidas de uso agrícola (Reglamento (CE) 396/2005 y sus posteriores modificaciones Reglamento (CE) 37/2010). Además, la Directiva 2007/52/CE que modifica a la Directiva 91/414/CEE, ha incluido las sustancias activas etoprofos, pirimifos-metilo y fipronil dentro del anexo I de dicha Directiva, donde se especifica cómo, cuándo y en qué casos se pueden utilizar aquellos productos que contengan dichas sustancias activas para garantizar que puedan autorizarse en todos los Estados miembros.

2. *Apis mellifera iberiensis*

2.1. Origen

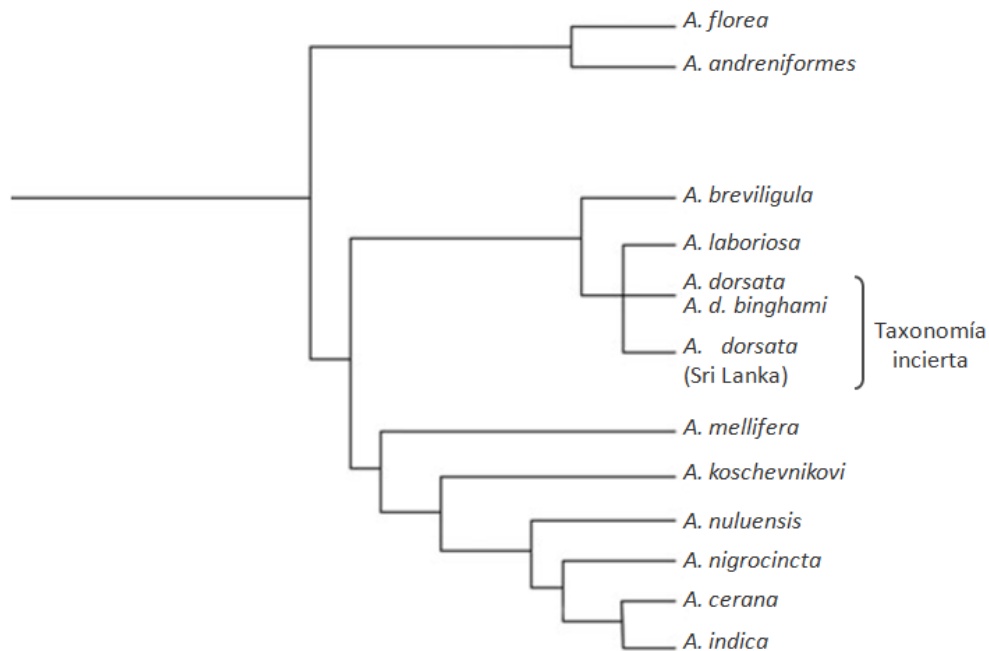
La abeja doméstica o abeja melífera (*Apis mellifera* L.) descrita por Linneo en 1758, pertenece a la familia Apidae incluida en el orden Hymenoptera, y es la especie de abeja con mayor distribución a nivel mundial.

Tradicionalmente la clasificación taxonómica de las especies del género *Apis* se ha realizado utilizando criterios como los caracteres morfológicos, de comportamiento (como la construcción de nidos) y la distribución geográfica observados a la hora de catalogar las especies (Ruttner, 1988). Por ello, numerosos taxónomos han llegado a describir más de 30 razas de abejas, entre variedades geográficas o subespecies. No obstante, la reciente aparición de los estudios moleculares para realizar filogenias

mediante el empleo de genes múltiples, tanto mitocondriales como nucleares (Arias y Sheppard, 2005; Raffiudin y Crozier, 2007; Lo y col., 2010), han modificado en gran medida la taxonomía de la abeja melífera. A partir de este tipo de análisis, Olroyd y Wongsiri (2006) establecieron la existencia de nueve especies dentro del género *Apis*, que son: *Apis florea*, *Apis andreniformis*, *Apis laboriosa*, *Apis dorsata*, *Apis mellifera*, *Apis koschevnikovi*, *Apis nuluensis*, *Apis nigrocincta* y *Apis cerana*.

Lo y col. (2010) estableció una nueva filogenia a la que añadió tres nuevos taxones dentro del género *Apis* (*Apis breviligula*, *Apis indica* y *Apis dorsata binghami*) basándose en características morfológicas, genéticas y de comportamiento (Fig. 1).

Figura 1.- Relaciones filogenéticas existentes entre los taxones del género *Apis* (Lo y col., 2010)



El análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) ha mejorado el conocimiento de la diversidad de *A. mellifera*, y además permite proponer diferentes hipótesis acerca del origen y la evolución de sus subespecies. Esta técnica molecular se emplea para el estudio del parentesco por vía materna, debido al hecho de que el ADN mitocondrial se hereda únicamente a través del óvulo, dado que los espermatozoides no aportan sus mitocondrias al cigoto (Meusel y Moritz, 1993; De la Rúa y col., 2005). Como resultado de ello, todas las obreras y zánganos descendientes de una misma reina comparten su ADNmt sin alteración alguna, salvo en los casos que puedan surgir mutaciones puntuales. Esta cualidad permite caracterizar a la abeja reina y a toda la

colmena analizando el ADNmt de una única obrera, pudiendo utilizar este tipo de ADN como un marcador molecular a nivel de colmena. En base a los resultados obtenidos empleando esta técnica se han podido establecer molecularmente cinco linajes evolutivos para la especie *Apis mellifera* (Garnery y col., 1992; 1995; Franck y col., 1998; 2000; 2001; Palmer y col., 2000; Hernández, 2002; De la Rúa y col., 2009; Jara y col., 2012), los cuales apoyan la clasificación descrita previamente por Ruttner y col., (1978). Los cinco linajes son:

Linaje A: constituido por especies africanas como *Apis mellifera intermissa*, *Apis mellifera scutellata*, *Apis mellifera lamarckii*, *Apis mellifera adansonii*, *Apis mellifera capensis* y *Apis mellifera iberiensis*.

Linaje M: abarca subespecies de Europa Occidental, incluyendo *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera iberiensis*.

Linaje C: comprende las subespecies de Europa Oriental, entre ellas *Apis mellifera ligústica* y *Apis mellifera carnica*.

Linaje O: incluye subespecies de Oriente Próximo como *Apis mellifera syriaca*, *Apis mellifera caucasica* y *Apis mellifera anatolica*.

Linaje Y: formado por una única subespecie: *Apis mellifera jemenitica*, procedente de Etiopía (Alattal y col., 2014).

Existen distintos haplotipos mitocondriales para cada linaje en función de la región intergénica del ARN transferente de la leucina (ARNt^{leu}) y la subunidad II del gen de la citocromo oxidasa (COII) (Garnery y col., 1991).

En la Península Ibérica, *A. m. iberiensis* posee una naturaleza híbrida con un componente norteafricano (linaje A) que predomina en el sur peninsular, con una distribución gradual que, en ocasiones es abruptamente reemplazado por el linaje europeo occidental hacia el norte (linaje M) (Smith y col., 1991; De la Rúa y col., 1998; 2001a, 2001b; 2004a, 2004b; Cánovas y col., 2002, 2008, 2011). Por tanto, el linaje A muestra un gradiente latitudinal en la península ibérica de dirección suroeste-noreste, en lugar de ser simplemente sur-norte, lo cual indica la existencia de un patrón de distribución atlántico ibero-marroquí. También se han encontrado áreas de hibridación entre los linajes A y M, aunque en algunas comunidades como Canarias, la Comunidad Valenciana y Cataluña, aparece un porcentaje variable del linaje C, supuestamente como resultado de la importación de colmenas (De la Rúa y col., 1998, 2001b, 2004b, 2005; Cánovas y col., 2008, 2011; Jara y col., 2012; Muñoz y col., 2014). REVISION 2009

Un estudio realizado por Whitfield y col. (2006) sobre poblaciones de abejas melíferas de todo el mundo, determinó que la especie *Apis mellifera* apareció en África hace unos dos millones de años y desde allí se expandió hacia Europa y Oriente Medio,

dando lugar a los 5 linajes establecidos por Ruttner (1988). Sin embargo, los recientes análisis realizados por Wallberg y col. (2014) no apoyan la hipótesis del origen africano de *Apis mellifera*, mostrando un parentesco más cercano con la abeja asiática. Estas investigaciones han demostrado que el grupo O está genéticamente muy emparentado con el grupo C, y además la especie *Apis mellifera syriaca* ha sido recientemente incluida en el linaje A (Wallberg y col., 2014).

2.2. Ciclo biológico e individuos de la colonia

La estructura social de una colonia de *Apis mellifera* se compone de tres tipos de individuos o castas. Estos individuos se organizan jerárquicamente en la colonia donde cada casta desempeña una función diferente. De este modo, la reina es la única hembra con capacidad reproductora, las obreras son hembras encargadas de realizar diversas tareas dependiendo de la edad y las necesidades de la colonia, y por último los zánganos son machos cuya función es fecundar a la reina.

Todas las castas pasan por las fases de huevo, larva, ninfa y adulto a lo largo de su desarrollo, y los procesos que sufren hasta completar su metamorfosis también son semejantes. Sin embargo, cada casta tiene un tiempo de desarrollo diferente (16 días las reinas, 21 las obreras y 24 los zánganos) y se crían en distintos tipos de celdas (las de mayor tamaño son de las reinas, seguidas por las de los zánganos y las más pequeñas son las de las obreras).

El ciclo biológico de las abejas melíferas empieza con la puesta de huevos por parte de la reina. El huevo es colocado en el fondo de la celdilla donde queda adherido por medio de una sustancia mucilagínosa que lo mantiene en una posición vertical. A medida que va pasando el tiempo, el huevo se inclina paulatinamente hasta colocarse horizontalmente. Después de tres días eclosiona una larva de color blanco perlado que será atendida por las abejas nodrizas. La larva sufrirá una serie de mudas y se irá enroscando progresivamente hasta juntar sus extremos. Tras el operculado de la celda (aproximadamente una semana después), que consiste en el sellado de la celda por las obreras con una fina capa de cera denominada opérculo, la larva se coloca verticalmente en el interior de la celda y segrega un capullo de seda que la envuelve por completo, donde permanecerá inmóvil hasta transformarse en ninfa o pupa. En este estadio comienzan a diferenciarse las tres regiones que componen el cuerpo del insecto (cabeza, tórax y abdomen), mientras se van desarrollando las patas, alas y antenas. La pigmentación de la ninfa comienza en los ojos, posteriormente la piel va tornándose cada vez más oscura con tonos que van desde el marrón amarillento hasta el negro. Una vez finalizado su desarrollo el individuo adulto procederá a roer el opérculo para salir de la celda.

La **reina** procede de un huevo fecundado (diploide) del que sale una larva que es alimentada durante todo su desarrollo con jalea real y se desarrolla en una celda

especial. La reina, cuando nace, abandona la colmena y, después de realizar varios vuelos de orientación, copula con varios zánganos en un único vuelo (nupcial) y almacena el semen en su espermateca. La reina es la única hembra fértil de la colmena, y comenzará la puesta de huevos en primavera. Dependiendo de las necesidades de la colonia, la reina pondrá huevos fecundados para criar obreras o sin fecundar para criar zánganos. La esperanza de vida de la reina es de tres o cuatro años, alcanzando su capacidad reproductora máxima alrededor de los dos años. Periódicamente y de forma natural será sustituida por una reina más joven con mayor capacidad reproductora y capaz de secretar una cantidad suficiente de feromonas reales que regulen el comportamiento de todas las abejas de la colonia.

Las **obreras** son los individuos de menor tamaño corporal, pero a la vez más abundantes dentro de la colonia. Surgen de huevos fecundados de los que saldrá una larva, cuya alimentación consistirá en jalea real los tres primeros días y una mezcla de miel, polen y agua (llamada pan de abejas) durante el resto de su desarrollo. Este cambio de alimentación inhibe el desarrollo de los órganos reproductores. En ellas el ovipositor se modifica para dar lugar a un aguijón constituido por glándulas abdominales que producen veneno y que utilizarán para la defensa de la colmena.

La esperanza de vida de las obreras varía en función de la época del año en la que ocurra su nacimiento, según los esfuerzos que realice durante su edad adulta. De modo que las abejas que nacen durante la primavera tienen una vida útil entre 25-35 días y, por el contrario, las que se crían a finales de verano o principios de otoño, pueden llegar a vivir entre seis y ocho meses (Maurizio, 1950; Free y Spenser-Booth, 1959).

Las tareas de las obreras en el interior de la colonia cambian a lo largo de su vida, ya que se ha demostrado la existencia de una relación edad-actividad (Rösch, 1927). Durante los primeros días (7-12 días) de vida se encargan de limpiar la colonia y alimentar a las crías y se las denomina abejas nodrizas. En este momento las glándulas hipofaríngeas adquieren su grado máximo de desarrollo para producir jalea real. Después de la tercera semana de vida, sus tareas no son tan concretas y están menos relacionadas con la edad. Comienzan sus primeros vuelos fuera de la colmena y realizan las tareas de mantenimiento de la colmena tales como limpieza, eliminación de larvas y abejas muertas, almacenamiento del polen en las celdas, construcción de panales, sellado de las celdas, maduración del néctar, aplicación de propóleos, recepción del néctar que traen las abejas que regresan del campo e incluso funciones de vigilancia. Pero una de sus tareas más importantes es la secreción de cera, dado que sólo las obreras presentan glándulas cereras. La cera se emplea para la construcción de las celdillas de los panales, las cuales sirven tanto para el desarrollo de las larvas y ninfas como para el almacenamiento de los alimentos (miel y polen) de la colonia.

La última fase de la vida de las obreras consiste en la búsqueda y recolección del alimento o también llamada pecoreo. A estas abejas se les denomina pecoreadoras y recogen polen, propóleo, néctar y agua para transportarlos al interior de la colmena. La trofalaxia es un comportamiento característico de las abejas que consiste en la transferencia de alimento de unas a otras utilizando la boca. Las abejas de interior distribuyen el néctar en las celdillas y le añaden enzimas que contiene su saliva, para dar lugar a la miel madura (17,5% H₂O), después de eliminar el exceso de agua. Las celdillas con miel son selladas con cera para evitar su fermentación.

La termorregulación dentro de la colmena también es una tarea muy importante, en este caso no depende ni de la edad ni de la casta (Jones y Oldroyd, 2007). La temperatura de la cámara de cría debe mantenerse alrededor de los 34,5°C (Kronenberg y Heller, 1982), dentro de un rango de 32-36°C, especialmente durante la metamorfosis, para evitar la aparición de malformaciones anatómicas en las abejas adultas.

Normalmente las actividades que realizan las obreras están relacionadas con la edad, pero en algunas ocasiones esta relación puede variar según las condiciones dentro y fuera de las colmenas. Las abejas de una misma edad cronológica tienen capacidad de cambiar con gran rapidez de “edad fisiológica”, gracias a la vitelogenina (VTG) y la hormona juvenil (HJ), pudiendo pasar a desarrollar tareas de abejas más adultas si fuera necesario (Robinson y Ben-Sahar, 2002; Johnson, 2003). Después del nacimiento, las hembras presentan una elevada concentración de ambas sustancias, con el tiempo la concentración de HJ va disminuyendo, mientras que la de VTG se mantiene estable. El paso de nodriza a pecoreadora está asociado con las variaciones en dichas concentraciones, cuando se van incrementando los niveles de HJ en hemolinfa y disminuyen los de VTG en el cuerpo de la abeja adulta. Además la HJ regula la síntesis de VTG (Amdam y Omholt, 2002) por lo que actúa como el principal regulador de los cambios fisiológicos y de comportamiento necesarios en cada momento.

Los **zánganos** son individuos de mayor tamaño que las obreras y proceden de huevos sin fecundar (haploides). Su misión principal es fecundar a las reinas vírgenes durante el vuelo nupcial, pero también colaboran en la termorregulación de la colmena. Cientos de zánganos comienzan a criarse en primavera bajo los cuidados de las obreras, coincidiendo con una mayor entrada de néctar. En cambio, a finales de verano, la colonia empieza a prepararse para la invernada y las obreras impiden el acceso de los zánganos a las reservas de miel y los expulsan de la colmena. Los zánganos no son capaces de succionar el néctar y, por ello, mueren de hambre y frío. Como los machos no recolectan néctar ni polen, cuando escasea el néctar, son eliminados en cualquier época del año.

2.3. Anatomía y fisiología

El cuerpo de las abejas presenta tres partes bien diferenciadas, que son: cabeza, tórax y abdomen. El exoesqueleto es una estructura quitinosa y rígida, compuesta por varios segmentos articulados que envuelven y protegen los órganos internos. Estos segmentos están unidos por tejido no quitinoso que aporta cierta flexibilidad al cuerpo y que, unido a la acción de los músculos, permiten el movimiento del insecto.

En la **cabeza** se localizan la mayoría de los órganos sensoriales, como las antenas, los ojos y el aparato bucal.

Las dos antenas se colocan en la parte frontal, formadas por varios segmentos de diferente tamaño llamados artejos, en cuyo extremo final (flagelo) residen los sentidos del olfato, del tacto y del oído.

Las abejas tienen dos tipos de ojos. Los simples u ocelos únicamente detectan los cambios de la intensidad lumínica, están implicados en la visión cercana y son muy útiles para las labores realizadas en el interior de la colmena. Mientras que, los ojos compuestos son los receptores de luz más importantes ya que proporcionan una visión panorámica, muy beneficiosa para la realización de tareas fuera de la colmena como la recolección y la orientación.

El aparato bucal de las abejas es de tipo lamedor-chupador el cual, en función de su uso, se divide en dos partes: trompa o probóscide para succionar, y mandíbulas para sujetar. El aparato bucal solo es exteriorizado por la abeja para libar o durante la trofalaxia, el resto del tiempo se mantiene replegado.

En la parte superior de la cabeza y debajo de la faringe se encuentran las glándulas hipofaríngeas que producen una secreción pastosa y lechosa denominada “jalea real”, que constituye el alimento de la abeja reina durante toda su vida y de las crías (obreras y zánganos) en sus tres primeros días de vida puesto que a partir del tercero se agrega polen y miel. Estas glándulas están muy desarrolladas en las obreras nodrizas pero se atrofian a medida que van envejeciendo. Son muy rudimentarias en la reina y los zánganos carecen de ellas.

En el **tórax** se insertan los apéndices locomotores de la abeja, que son las patas y las alas, y por ello los músculos en esta región son mucho más potentes que en el resto del cuerpo. El tórax se divide en tres segmentos: el protórax (1^{er} anillo torácico), del que surge el primer par de patas con una estructura circular que sirve para limpiar las antenas; el mesotórax (2^o anillo torácico), de donde sale el segundo par de patas y el primer par de alas, recorridas por una serie de nervaduras que dan consistencia a la estructura membranosa; el metatórax (3^{er} anillo torácico) donde se insertan el segundo par de alas y el tercer par de patas (de mayor tamaño). En el caso de las

obreras, la tibia de estas patas presenta una superficie cóncava y rodeada de pelos formando un espacio llamado corbícula, donde transportan el polen y los propóleos. Por último, el propodio es el segmento que une el tórax y el abdomen.

El **abdomen** de las abejas se compone de nueve segmentos tapizados internamente por el cuerpo graso, constituido por finas capas celulares que actúan como reservas alimenticias. En la cavidad abdominal, a la altura del séptimo terguito, se encuentran las glándulas aromáticas o de Nassanov, las cuales secretan una feromona capaz de modificar el comportamiento de las abejas, con el fin de atraer y orientar a los demás miembros de la colonia. Las glándulas cereras se localizan en la parte ventral de las obreras y su secreción se emplea en la elaboración y reparación de las celdillas del panal. La secreción de la cera requiere temperaturas ambientales superiores a los 25-30°C y se asocia con un alto consumo de miel o néctar.

La **anatomía interna** de la abeja consta de los siguientes aparatos y sistemas:

El aparato digestivo comienza por la abertura bucal en la parte anterior y continua por la faringe hasta el esófago, recorriendo la región del tórax. Cuando llega a la región abdominal, el esófago se dilata formando el buche melario, donde se produce la primera transformación del néctar en miel. A continuación, la válvula ventricular dirige el flujo hacia el ventrículo, donde tiene lugar la digestión de los alimentos. En el último tramo se encuentra el intestino medio o delgado, cuya función es la absorción de nutrientes, y donde desembocan los órganos secretores o tubos de Malpigio con función depuradora. El tracto digestivo termina en el intestino posterior o ampolla rectal, una dilatación donde se almacenan las heces que serán expulsadas por el orificio anal al exterior.

El sistema circulatorio es abierto y se compone principalmente de hemolinfa, líquido de color amarillento que recorre todas las cavidades en contacto directo con los órganos para repartir los alimentos y conducir los productos de desecho hacia los tubos de Malpigio.

El aparato respiratorio también es abierto y está constituido por un conjunto de tráqueas y sacos aéreos en el interior de tórax y abdomen, que ocupan casi toda la cavidad corporal de la abeja y que se llenan de aire para facilitar el vuelo. Las tráqueas se abren hacia el exterior por medio de los espiráculos respiratorios. Una abeja tiene 10 pares de espiráculos, repartidos entre el tórax (3) y el abdomen (7), con una membrana que controla el flujo de aire. De esta manera se consigue que el oxígeno del aire llegue directamente a los tejidos, por lo tanto se trata de una respiración abierta.

El sistema nervioso se divide en un sistema central y otro estomatogástrico. El sistema central se compone del ganglio cerebral y una cadena nerviosa ventral con siete ganglios que inervan diferentes regiones del cuerpo. Este sistema se comunica

con el medio exterior por medio de los nervios sensitivos y motores. El sistema estomatogástrico controla tanto la actividad de los órganos y aparatos internos como los espiráculos respiratorios y la digestión. Además, las abejas melíferas poseen un sistema químico muy desarrollado y particular que se basa en la liberación de feromonas encaminadas a coordinar y dirigir el comportamiento de todos los individuos de la colonia. La feromona secretada por la reina permite identificar a las obreras de la misma colonia, atraer a los zánganos en el vuelo nupcial, estimular la agregación de los enjambres o impedir la construcción de realeras; mientras que las propias obreras pueden “comunicarse” entre ellas y agregarse utilizando otro tipo de feromonas.

El nivel de desarrollo del aparato reproductor depende de la casta, llegando a completarse en la reina y en los zánganos, mientras que está atrofiado en el caso de las obreras debido al tipo de alimentación recibida durante la fase larvaria, así como por el control que ejercen sobre ellas las feromonas producidas por las glándulas mandibulares de la reina. Cuando una colmena pierde su reina o ésta muere, la desaparición de la feromona real permite el desarrollo de los ovarios de las obreras hasta llegar a poner huevos. Estos huevos se desarrollan por partenogénesis produciendo exclusivamente individuos haploides que serán siempre machos.

El aparato genital de los zánganos se compone de dos testículos, dos canales eferentes, dos vesículas seminales que contienen los espermatozoides, dos glándulas mucosas, un canal eyaculador y un órgano copulador que después del apareamiento queda en el interior de la hembra, provocando la muerte del macho tras la cópula. Respecto al aparato reproductor de la reina, presenta dos grandes ovarios formados por tubos ováricos u ovariolas, donde se forman y maduran los óvulos. Las ovariolas desembocan en los oviductos y éstos a su vez en la vagina junto con el conducto espermático de la espermateca, donde estaban almacenados los espermatozoides. La bolsa copuladora es una dilatación de la vagina y en ella ocurre la fecundación de los huevos que finalmente saldrán a la celdilla correspondiente a través del orificio situado bajo el aguijón.

El aparato defensivo aparece únicamente en las hembras, por lo que está ausente en zánganos. Está formado por una glándula ácida y otra alcalina, que vierten sus secreciones en el receptáculo del veneno (Kerr y Lello, 1962; Lello, 1971). A continuación, se encuentra la vaina del estilete y el aguijón dotado de un número variable de espinas curvadas (mayor en las obreras que en las reinas), que permiten su anclaje, pero ello causa la evisceración de la abeja al tratar de retirarlo, debido a que está unido a la parte posterior del tubo digestivo. Las abejas, al perder el aguijón cuando defienden la colonia, son capaces de liberar una feromona de alarma que sirve para alertar al resto de individuos de la colonia y estimular un comportamiento agresivo hacia la víctima que ha sido picada.

2.4. Biología de la colonia

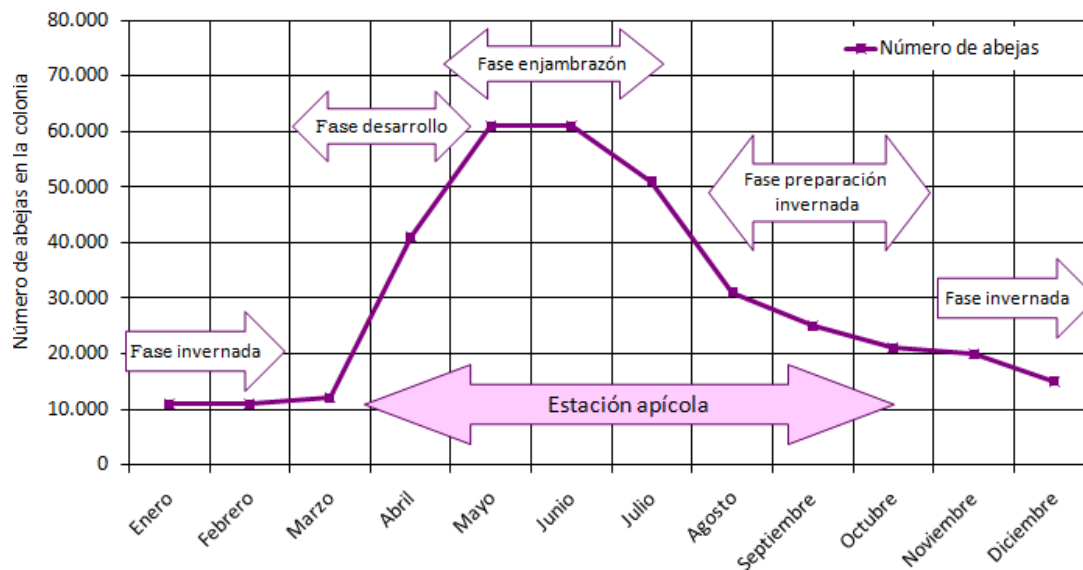
Una colonia es un grupo de abejas melíferas compuesto por las tres castas (reina, obreras y zánganos) diferenciadas y especializadas en sus actividades, las cuales conviven en un determinado hábitat con el que interactúan. Cada individuo por separado carece de valor en la colonia respecto a la importancia que supone la colectividad como una unidad. Por ello, la colonia entera se considera como un superorganismo que se mantiene gracias a la colaboración de todos los individuos, permitiendo de esta manera la supervivencia indefinida del grupo, mientras que los individuos tienen una vida de corta duración. Se hablaría de colmena, cuando el apicultor introduce la colonia a sus cajones ya que de forma natural, la colonia puede habitar en los huecos de los árboles, grietas de las rocas, recipientes o construcciones humanas. Debido a las características del apareamiento de esta especie, una colonia de abejas puede contener abejas obreras con diferente grado de parentesco.

La población de abejas melíferas en una colmena en un clima mediterráneo, como es el caso de España, pasa por las siguientes fases (Fig. 2):

Fase de invernada: comienza a finales de otoño y se prolonga hasta el inicio de la primavera. En el transcurso de este período la actividad de la colonia se reduce en gran medida por la falta de floración, la disminución de la temperatura exterior y las adversas condiciones climáticas propias del invierno, obligando a las abejas a permanecer encerradas dentro de la colmena. El tamaño de la colonia en esta fase oscila entre 5.000 y 15.000 individuos, en su mayoría obreras (AFSSA [ahora llamada ANSES], 2009). El crecimiento de la cría se detiene debido al descenso de la temperatura exterior y las ocupaciones de la colonia se vuelcan principalmente en el mantenimiento de la temperatura interior de la colmena. Para ello, las abejas se agrupan formando una bola compacta (racimo o piña) y se alimentan de las reservas de miel más próximas. Cuando la temperatura interior desciende hasta los 10 ó 12°C, las abejas se entumescen y se mueven con dificultad. Por debajo de los 10°C, se quedan totalmente paralizadas y dejan de comer, llegando incluso a morir de frío y/o hambre.

Fase de desarrollo: es la etapa de mayor crecimiento de la población de abejas y se caracteriza por las tareas de pecoreo y por el desarrollo de la cría en el interior. Comienza con la llegada de la primavera, que conlleva el aumento de la temperatura, la aparición de polen y la existencia de valores de humedad relativa adecuados para la incubación de las larvas. La reina de cada colmena, recién fecundada o fecundada con anterioridad, comienza la puesta y durante este período llega a poner entre 800 y 2000 huevos al día, alcanzando los 3000 en el pico máximo de la expansión. Estos huevos pueden ser fecundados, produciendo obreras estériles, o sin fecundar, originando zánganos. La cantidad de cría en los panales aumenta paulatinamente y el número de individuos en la colonia oscila entre los 40.000 y 60.000 (AFSSA [ANSES], 2009).

Figura 2.- Fluctuación teórica de la población de abejas de una colonia en el curso de un año en climas templados (AFSSA, 2009) (Esquema extraído de Garrido-Bailón, 2012)



Fase de enjambrazón: Esta fase no siempre ocurre, pero en caso afirmativo suele ocurrir durante la primavera o a principios del verano. Se trata de un mecanismo natural para la multiplicación de la colonia en el cual intervienen varios factores desencadenantes, tales como la falta de espacio dentro de la colmena, el incremento de la temperatura de la colonia, una disminución o pérdida de la feromona real, un desequilibrio entre nodrizas y pecoreadoras, la aparición de agentes patógenos, la genética, la climatología y procesos idiopáticos. Independientemente del tipo de circunstancias que inducen a una colonia a enjambrazar, una vez que la abeja reina de más edad decide hacerlo, abandona la colmena acompañada por gran cantidad de obreras (enjambre) y dejando el resto de la población a cargo de la nueva reina más joven.

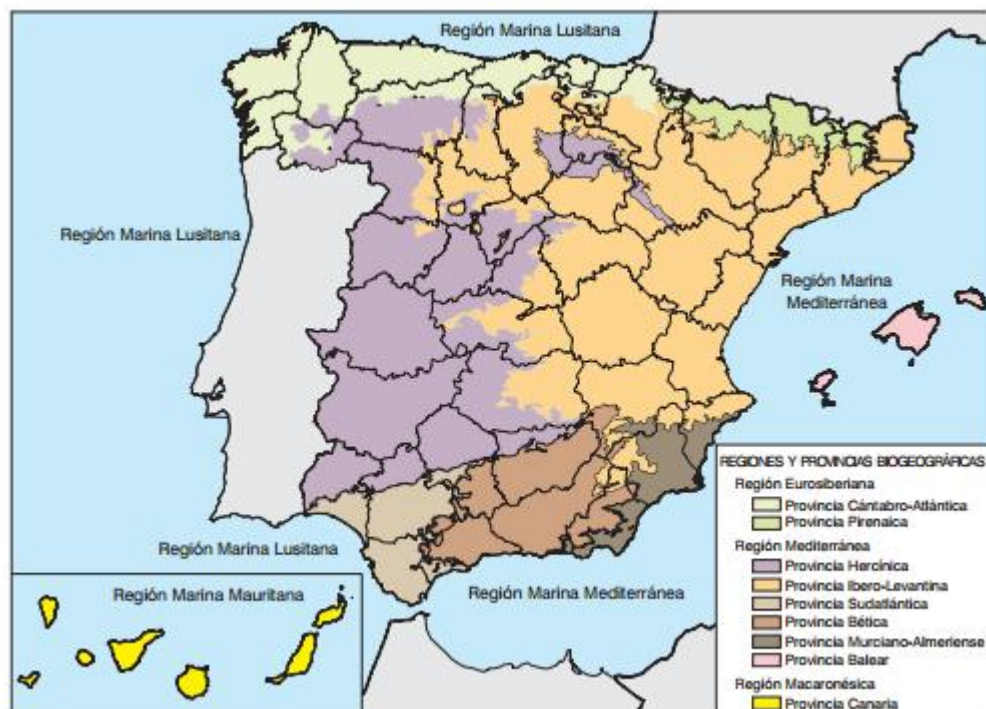
Fase de preparación para la invernada: Cuando comienza el otoño, la colonia disminuye el volumen de su población como preparación para la etapa invernal. En este momento las obreras impiden la entrada de los zánganos a la colmena, los cuales terminarán muriendo como se comentó anteriormente. Las abejas situadas en la piquera realizan movimientos laterales y parece como si estuvieran limpiando algo con las mandíbulas. A los pocos días de haber realizado este “ritual” comienzan a agruparse, formando la típica bola compacta de la invernada y la actividad se reduce tanto exterior como interiormente, lentamente hasta detenerse por completo. Cuando la sequía coincide con el final de las floraciones, las abejas pueden llegar a realizar las tareas de preparación para la invernada y, con la llegada de las floraciones de inicio de otoño, realizarán una pequeña recolección y volverán pronto a su situación de reposo. Esto demuestra la perfecta coordinación existente entre la colonia de abejas y la flora del lugar. En cualquier caso, mientras las condiciones climáticas exteriores no sean

favorables y, sobre todo, siempre que la temperatura ambiente esté por debajo de 10°C, las abejas permanecerán recogidas dentro de la colmena.

3. Clasificación bioclimática de España

Existen innumerables clasificaciones climáticas que coexisten actualmente en España. En general, todas utilizan datos pluviométricos y datos térmicos más o menos combinados para definir umbrales que condicionan la vida de determinadas formaciones vegetales por exceso de frío o de calor, o por sequía en distintas épocas del año. En este caso se eligió la clasificación de Rivas-Martínez (1987), quien clasifica los fitoclimas de España teniendo en cuenta una serie de índices bioclimáticos, en los que valora la temperatura, la precipitación y la altura de cada área. La flora y vegetación de la Península Ibérica, Baleares y Canarias, que está incluida en el reino floral Holártico, se distribuye en tres regiones corológicas: Eurosiberiana, Mediterránea y Macaronésica (Fig 3). A la región Eurosiberiana pertenece el borde septentrional y marítimo de la España continental. La región Mediterránea comprende la mayor parte de la superficie peninsular y las Islas Baleares. Por último, a la región Macaronésica pertenecen sólo las Islas Canarias, cuya insularidad y variedad litológica le confieren particularidades florísticas únicas en Europa.

Figura 3.- Mapa de zonificación biogeográfica de España según Rivas-Martínez (1987)
(Fuente: Zonificación del territorio nacional, MAGRAMA)



A su vez, dentro de estas tres regiones corológicas España se divide en 15 pisos bioclimáticos, cuyos principales índices e intervalos termoclimáticos de diagnóstico aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1.- Clasificación climática de España (Rivas-Martínez, 1987)

Región	Piso	Definición Piso	Características Piso
EUROSIBERIANA	A	Piso alpino	T < 3°, m < -8°, M < 0°, It < -50, H 1-12, V: macroserie de pastizales alpinos
	B	Piso subalpino	T 6 a 3°, m -4 a -8°, M 3 a 0°, It 50 a -50, H 1-12, V: pinar, abetal y enebreal rastrero
	C	Piso montano	T 12 a 6°, m 2 a -4°, M 10 a 3°, It 240 a 50, H 9-6, V: pinar, abetal, hayedo y robledal
	D	Piso colino	T > 12°, m > 2°, M > 10°, It > 240, H 11-4, V: robledal y posible pinar
MEDITERRÁNEA	E	Piso crioromediterráneo	T < 4° m < -7°, M < 0, It < -30, H 1-12, V: pastizales psicoxerófilos
	F	Piso oromediterráneo	T 8 a 4°, m -4 a -7°, M 2 a 0°, It 60 a -30, H 1-12, V: pinar, enebreal, sabinar
	G	Piso supramediterráneo	T 13 a 8°, m -1 a -4°, M 9 a 2°, It 210 a 60, H 9-6, V: hayedo, melojar, sabinar, quejigar, pinsapar y encinar
	H	Piso mesomediterráneo	T 17 a 13°, m 4 a -1°, M 14 a 9°, It 350 a 210, H 10-4, V: encinar puro y alcornocal
	I	Piso termomediterráneo	T 19 a 17°, m 10 a 4°, M 18 a 14°, It 470 a 350, H 12-2, V: encinar termófilo, lentiscales
	J	Piso inframediterráneo	T > 19°, m > 10°, M > 18°, It > 470, V: lentisco y matorral de tomillo
MACARONÉSICA	K	Piso orocanario	T < 6°, m < -2°, M < 4°, It < 80, H 9-6, V: vegetación glerícola del Teide
	L	Piso supracanario	T 11 a 6°, m 2 a -2°, M 9 a 4°, It 220 a 80, H 9-5, V: macroserie seca de la retama del Teide
	M	Piso mesocanario	T 15 a 11°, m 6 a 2°, M 13 a 9°, It 340 a 220, H 12-2, V: macroserie seca del pino canario
	N	Piso termocanario	T 19 a 15°, m 11 a 6°, M 18 a 13°, It 480 a 340, H O, V: macroserie semiárido-seca de la sabina y laurisilva
	O	Piso infracanario	T > 19°, m > 11°, M > 18°, It > 480, H O, V: macroserie árido-semiárido del cardón

T: temperatura media anual (°C); **m:** temperatura media de las mínimas del mes más frío (°C); **M:** temperatura media de las máximas del mes más frío; **It:** índice de termicidad (T+m+M) x 10; **H:** meses en los que, estadísticamente, son posibles las heladas; **V:** tipo de vegetación.

4. Agentes nosógenos de la abeja melífera

Las abejas melíferas se clasifican como insectos sociales dado que conviven formando colonias y no pueden vivir de manera independiente. Por esta razón, en apicultura la colmena se considera como la unidad básica y funcional desde el punto de vista epidemiológico y productivo, siendo el lugar donde reside la colonia de abejas. Por lo tanto, el concepto de salud y el de enfermedad están referidos a ella. La alteración de la salud influye directamente en la producción de los distintos productos de las abejas, lo cual reduce su rentabilidad y en la mayoría de los casos las colonias afectadas suponen un riesgo sanitario para otras colmenas. De modo que cuando se habla de enfermedad en apicultura, como animales de origen ganadero, se puede considerar como un estado clínico o subclínico sanitario y/o productivo.

Una colonia de abejas melíferas es susceptible a la acción de diversos agentes nosógenos. Entendiendo por agente nosógeno aquel que es capaz de causar una enfermedad física en la abeja, como por ejemplo la presencia de bacterias, virus, parásitos, la exposición a plaguicidas o la carencia de algún elemento nutricional, etc. De acuerdo con este concepto, la enfermedad propiamente dicha se define como el descenso de la capacidad máxima de la productividad, puesto de manifiesto mediante la influencia de un agente nosógeno. Acorde con lo anterior no se puede hablar de

enfermedad ante la presencia de un único agente nosógeno, sino que debe ir acompañado de una modificación estructural o funcional que perjudique negativamente al estado de bienestar.

El descenso que están sufriendo las poblaciones de abejas melíferas en todo el mundo desde principio del siglo XXI se ha convertido en la principal preocupación de muchos investigadores y autoridades sanitarias durante los últimos años. A este fenómeno generalizado de pérdida de colonias de abejas se le ha denominado “Síndrome de Despoblamiento de Colmenas” (SDC) en Europa (Higes y col., 2005; 2010b; Potts y col., 2010) y “Colony Collapse Disorder” (CCD) en EE.UU (Cox-Foster y col., 2007; VanEngelsdorp y col., 2009) cuyas principales características son la desaparición de la mayor parte de la población de abejas obreras de una colmena en un corto período de tiempo, sin unos síntomas y signos clínicos previos. La pérdida de un elevado número de abejas en un corto período de tiempo conduce al colapso de la colonia, ya que las obreras y la reina no pueden mantener la homeostasis de la colonia ni el equilibrio entre los individuos que desarrollan diferentes tareas en la misma (Betti y col., 2014). En muchas ocasiones, las colmenas despobladas muestran reservas de miel y polen abandonados por las abejas.

Este fenómeno fue detectado en el Centro Apícola Regional a finales de los años 90 y principios del siglo XXI en España y unos años antes en Francia. La primera hipótesis a cerca de las causas responsables de dicha situación fue planteada en Francia siendo atribuida a la acción tóxica de determinados plaguicidas neonicotinoides de uso agrícola (en concreto la imidacloprida). En Francia se realizaron varios estudios para dar una explicación científica a las denuncias realizadas por el sector apícola con respecto al uso de este insecticida neonicotinoide en las semillas de girasol. Sin embargo, los resultados obtenidos no explicaban los síntomas observados en las colmenas (Faucon y col., 2005). En España, en el momento de aparición de los primeros casos de “despoblamiento” y hasta el pico máximo producido durante el otoño del año 2004 (Higes comunicación personal) la utilización de imidacloprida en el recubrimiento de las semillas de girasol, no estaba autorizada, mientras que el uso de otro insecticida sistémico como el fipronil con este mismo fin, comenzó a utilizarse en el verano del año 2004 y solamente en un área muy reducida del país (Higes comunicación personal), por lo que su acción tóxica sobre las abejas, se restringiría a zonas muy concretas del país y no explicarían, por tanto, en ninguno de los dos casos el fenómeno generalizado de mortalidad y despoblamiento observada en los colmenares españoles en los años 2004 y 2005 (Higes y col., 2005).

Dado que parecía improbable que los insecticidas sistémicos (neonicotinoides y fenilpirazoles) fueran los responsables de este fenómeno generalizado en toda España, nuestro equipo de investigación investigó otras hipótesis (Higes y col., 2005). Resultado de este trabajo a finales de 2005 nuestro equipo de trabajo detectó por

primera vez, en el mundo, la presencia del microsporidio *N. ceranae* parasitando a *A. mellifera* en colmenares afectados por despoblamiento (Higes y col., 2005).

Posteriormente, una elevada pérdida de colonias de abejas fue descrita en los Estados Unidos (Van Engelsdorp y col., 2008), mientras que en la actualidad afecta también a Europa (COLOSS, 2009). Aunque no existe un consenso acerca de la causa que desencadena este fenómeno (Van Engelsdorp y col., 2009; 2010), actualmente se considera que los patógenos juegan un papel clave en este proceso (Cox-Foster y col., 2007; Higes y col., 2010a; 2013a; Evans y Schwarz, 2011; Doublet y col., 2015), bien actuando como única causa o, actuando de manera sinérgica con otros agentes nosógenos (Francis y col., 2013a; Ravoet y col., 2013).

Entre los agentes patógenos que han sido directamente relacionados con el fenómeno de despoblamiento y pérdida de colonias de abejas, se encuentran el ácaro *Varroa destructor*, y los virus asociados con este ácaro (Dainat y col., 2012; Francis y col., 2013a), y el microsporidio *Nosema ceranae* (Higes y col., 2006; 2009a; Goblirsch y col., 2013; Botías y col., 2012a, 2013; Wolf y col., 2014). Respecto a otros agentes nosógenos como son los plaguicidas, no todos los estudios apoyan su papel como único agente etiológico del fenómeno anteriormente comentado (Nguyen y col., 2009; Garrido-Bailón y col., 2010; Bernal y col., 2011; Yañez y col., 2013; Pilling y col., 2013; Stewart y col., 2014), aunque sí podrían ejercer una acción negativa sobre las colonias de abejas u otros polinizadores en determinadas condiciones agrícolas y medio ambientales (ver Carreck y Ratnieks, 2014). Otros factores como diferentes técnicas de manejo y el cambio climático también podrían intervenir en la pérdida de las colonias de abejas (Harbo, 1993).

En consecuencia, los agentes nosógenos más importantes que afectan a las abejas melíferas se dividen en dos grupos: bióticos (de origen parasitario o infeccioso) y abióticos (plaguicidas).

4.1. Agentes nosógenos bióticos: Patógenos

Dentro del grupo de agentes bióticos se pueden clasificar según su origen en parásitos o agentes infecciosos.

Los parásitos son organismos que viven a costa de otro individuo, denominado hospedador, alimentándose de las sustancias que éste elabora y perjudicándole, aunque sin llegar a producirle la muerte. Estos agentes nosógenos pueden llegar a provocar una enfermedad en el hospedador cuando coexisten con otros factores que fomentan su transmisión, desarrollo, multiplicación o virulencia.

En función de la localización en los hospedadores se distinguen dos tipos de parásitos: aquellos que se sitúan en la superficie de otro organismo se conocen como

parásitos externos o ectoparásitos, y los que viven dentro del cuerpo de un animal o planta se denominan parásitos internos o endoparásitos, ya sea en las cavidades orgánicas, en las vísceras, bien en el lumen o en el seno de los tejidos, en situación intercelular o intracelular (Martínez y Cordero, 1999). Ambos grupos de parásitos son organismos con un alto grado de especialización a este modo de vida, el cual han adquirido a lo largo de muchos años de coevolución con sus hospedadores y que les ha conducido a desarrollar diversas estrategias para evitar los mecanismos de defensa de sus hospedadores, en este caso las abejas melíferas, llegando incluso a tolerar los medicamentos que se utilizan para su control. Las colonias de abejas son capaces de soportar cargas parasitarias leves, mientras que las cargas parasitarias muy elevadas les dañan gravemente e incluso pueden causar su muerte o desaparición.

Se debe tener en cuenta la diferencia entre parasitismo y parasitosis. Parasitismo es la relación que se establece entre dos especies diferentes, ya sean vegetales o animales, donde interviene dos agentes biológicos: el parásito, que vive a expensas de la otra especie, a la que se le denomina hospedador. La parasitosis es una enfermedad producida por un parásito, la cual puede ser subclínica o clínica, y establece un *continuum* con el parasitismo entre la presencia de un reducido número de parásitos no lesivos hasta una patología grave por diversos factores como un incremento en su número.

Por otro lado, entre los agentes bióticos de origen infeccioso se encuentran las bacterias, los hongos y los virus.

Las bacterias son microorganismos unicelulares primitivos, que carecen de una membrana nuclear alrededor de su material genético y de otras estructuras que poseen las células de organismos superiores. Algunas bacterias son capaces de elaborar su propia materia orgánica (autótrofas), y por el contrario otras no poseen esta capacidad y dependen de la materia orgánica (heterótrofas) por lo que actúan como parásitas, simbioses o saprofitas.

Los hongos son microorganismos de tamaño muy variado y reproducción preferentemente asexual (por esporas), que pueden comportarse como parásitos de otros seres vivos o como saprofitos. Los hongos que infectan a las abejas son microscópicos.

Los virus que afectan a las abejas melíferas suelen producir infecciones asintomáticas pudiendo atacar a los diferentes estadios y castas de la colonia, acortando su vida bajo ciertas condiciones favorables para el desarrollo de la infección (Ball y Allen, 1988; Martin, 2001).

Las enfermedades ocasionadas por los principales agentes bióticos que afectan a las abejas melíferas son las siguientes:

4.1.1. Varroosis (agente *Varroa destructor*)

Varroa destructor es un ácaro externo que provoca una enfermedad conocida como varroosis, que afecta a las abejas obreras, reinas y zánganos (Bailey, 1981; Ritter, 2001). Este agente etiológico ha sido objeto de muchas investigaciones por su gran capacidad de dispersión y su efecto devastador sobre las colonias de abejas, llegando actualmente a ser considerado como uno de los factores más influyentes en el síndrome de despoblamiento de colmenas a nivel mundial (Brodschneider y col., 2010; Chauzat y col., 2010; Dahle, 2010; Genersch y col., 2010; Guzman-Novoa y col., 2010; Schäfer y col., 2010; Topolska y col., 2010; VanEngelsdorp y col., 2011; Martín y col., 2012; Nazzi y col., 2012; Becher y col., 2014; Forfert y col., 2015).

4.1.1.1. Etiología de la varroosis

Los ácaros varroa fueron descubiertos por primera vez por Edward Jacobson hace más de 100 años parasitando a *Apis cerana* en Java (Indonesia), y fueron clasificados como *Varroa jacobsoni* por Oudemans en 1904 (citado por Dietemann y col., 2013) e incluidos en la familia Varroidae (Delfinado-Baker y Baker, 1974). En el año 2000, Anderson y Trueman, mediante estudios moleculares, demostraron que las abejas europeas estaban parasitadas por otra especie de ácaro distinta a la especie descrita por Oudemans en 1904 y le dieron el nombre de *Varroa destructor*. En la actualidad, el género *Varroa* se compone de cuatro especies que son: *V. jacobsoni* (Oudemans, 1904 citado por Dietemann y col., 2013) y *V. underwoodi* (Delfinado-Baker y Aggarwal, 1987) que parasitan *Apis cerana*; *V. rindereri* (De Guzman y Delfinado-Baker, 1996) asociada a *Apis koschevnikovi*, y por último *V. destructor* (Anderson y Trueman, 2000), capaz de afectar a *A. cerana* y *A. mellifera*.

La subunidad 1 del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa (cox1) de varroa ha sido utilizada como marcador para identificar los distintos ácaros de las grandes poblaciones incluidas dentro de la especie *V. destructor* (como las poblaciones insulares) (Anderson y Trueman, 2000). Como las poblaciones más pequeñas dentro de estas poblaciones más grandes pueden ser identificadas por datos obtenidos de secuencias concatenadas a partir de los genes cox3, atp6 y cytb del ADN mitocondrial, las distintas poblaciones de mayor tamaño han sido denominadas “haplogrupos” y las poblaciones más pequeñas dentro de ellas “haplotipos” (Navajas y col., 2010). A partir de estos estudios se ha determinado la existencia de dos haplogrupos capaces de infectar a las abejas melíferas (Anderson y Fuchs, 1998), denominados coreano (K1) y japonés (J1) en base al lugar donde fueron encontrados inicialmente. A su vez, cada uno de estos haplogrupos se subdividen en dos haplotipos: J1-5 y J1-6; K1-2 y K1-5 (Navajas y col., 2010), de los cuales solo dos de ellos (J1-5 y K1-2) afectan a *A. mellifera*.

Varroa destructor es un ectoparásito obligado, fuertemente adaptado a su hospedador, ya que sin él su supervivencia no supera las 48 h (De Guzmán y col., 1993). Los aspectos morfológicos de este ácaro que demuestran su alta adaptación al parasitismo son: su forma esférica aplanada y la situación de las extremidades en la mitad anterior para una mejor sujeción en su hospedador; el aparato genital, ya que parte de la maduración de los espermatozoides ocurre en las espermatecas del aparato reproductor femenino; y los órganos sensoriales, ya que algunos extractos químicos de la cutícula de las larvas y de su alimento estimulan la oviposición y la atracción de los ácaros (Trouiller y Milani, 1999; Donzé y col., 1998; Calderone y Lin, 2001 citado por Dietemann y col., 2013).

Existe un marcado dimorfismo sexual entre los ácaros *V. destructor* (Ifantidis, 1983). Las hembras adultas son diploides, de color marrón rojizo, con un tamaño de 1.1 mm x 1.6 mm y presentan una forma ovalada con el dorso cubierto por numerosos pelos protectores rígidos y ramificados. En cambio, los machos y las etapas de ninfa femeninas son más pequeños (0,7 mm la protoninfa, 1 mm deuteroninfa femenina, 0,7 mm deuteroninfa masculina y macho adulto) y de color crema o blanco. Además, los machos adultos son haploides y presentan una forma esférica. A diferencia de la hembra, el macho completa su desarrollo en el interior de la celda y nunca emerge de la misma (Ritter, 2001). Todas las fases del desarrollo se ven a simple vista en el interior de las celdillas de cría.

Tanto en los machos como en las hembras, el cuerpo se divide en dos partes bien diferenciadas. El idiosoma es la parte mayoritaria y está compuesto por una placa dorsal, muy esclerotizada en la hembra adulta, y varias placas ventrales unidas por membranas delgadas y flexibles. Sin embargo, el grado de esclerotización en el macho es mucho menor, quedando limitada a las patas y al escudo dorsal, por ello tiene una menor pigmentación. El gnatosoma se localiza en la parte antero-ventral y contiene las piezas bucales para perforar la cutícula de la abeja y succionar la hemolinfa, aunque también desempeña una función sensorial.

El aparato bucal presenta una apertura con labios alrededor y un par de apéndices en su interior llamados quelíceros, los cuales a su vez están formados por tres segmentos (basal, medio y distal) duros y afilados. Estos segmentos presentan diferencias entre los dos sexos: en las hembras el segmento distal presenta cierta movilidad y dos pequeños dientes, que sirven para perforar la membrana intersegmentaria de la abeja a la hora de alimentarse y también intervienen en la fijación del ácaro a su hospedador (De Ruijter y Kaas, 1983 citado por Garrido-Bailón, 2012); el segmento distal en los machos se ha convertido en un tubo denominado espermatodáctilo para transferir el esperma al tracto genital femenino (Milani y Nannelli, 1988 citado por Rosenkranz y col., 2010).

El ciclo biológico del ácaro se compone de dos fases: forética (externa), y reproductiva (interna). La etapa forética consiste en el período de tiempo en que una hembra fecundada está sobre el cuerpo de las abejas, mientras que la etapa reproductiva tiene lugar en el interior de las celdas de cría operculadas con una duración que varía entre 12 y 15 días, dependiendo del tipo de cría parasitada (obreras o zánganos respectivamente).

La fase forética tiene lugar entre los segmentos abdominales y torácicos de las abejas adultas con una duración variable que oscila desde siete u ocho días hasta varios meses, dependiendo de la existencia de cría en las colmenas. Esta fase sólo se produce en las hembras adultas, ya que los machos y las fases inmaduras no son capaces de sobrevivir fuera de las celdillas. Debido al mayor contacto con la cría, las abejas jóvenes presentan cargas parasitarias superiores a las abejas de mayor edad dedicadas a la búsqueda de alimento (Donzé y col., 1998; Harris y Harbo, 2001).

El ciclo biológico se inicia cuando una o varias hembras fecundadas del ácaro entran en la celda de obrera o zángano antes de ser operculada guiadas por las señales químicas volátiles (Trouiller y Milani, 1999). Una vez ahí, el ácaro se desplaza al fondo de la celda, ocultándose de las obreras en el alimento de la larva y permaneciendo inmóvil hasta que esta lo consuma (Ifantidis y col., 1988), mientras las abejas nodrizas sellan la celdilla. Una vez sellada, la hembra sube sobre la larva y succiona su hemolinfa. En este momento la larva comienza su metamorfosis, aunque el ácaro permanecerá sobre el cuerpo de la pupa en la parte anterior de la celdilla durante todo su desarrollo, alimentándose siempre en la zona abdominal. Transcurridas entre 60-70 h, el ácaro hembra pone su primer huevo no fecundado (Ifantidis y col., 1983), que dará lugar a un ácaro macho haploide. Mediante el sistema de determinación del sexo haploide-diploide, 30 h más tarde el ácaro hembra pondrá otro huevo fecundado del que saldrá una varroa hembra diploide, y continuará poniendo huevos fecundados cada 30 h que darán origen a varroas hembras fértiles (Ifantidis, 1990 citado por Rosenkranzy col., 2010; Martín, 1994; Rehm y Ritter, 1989). Los huevos de varroa son esféricos, de color blanquecino y presentan un tamaño medio de 0,6 x 0,5 mm y cada hembra puede poner hasta 5 ó 7 huevos en cría de obreras y zánganos respectivamente (Martín, 1994; 1995; Garrido y col., 2003).

Los ácaros pasan por 4 fases a lo largo de su desarrollo hasta convertirse en adultos. Inicialmente del huevo eclosiona una larva con 6 patas sin segmentar, la cual se transforma en una protoninfa de color blanco y contorno redondeado que tiene 4 pares de patas. Las protoninfas que forman hembras son de mayor tamaño que las protoninfas que desarrollan machos. La siguiente fase se parece más al adulto y se denomina deuteroninfa, no está esclerotizada y tiene cuatro pares de patas largas en los machos, que por el contrario son cortas y robustas en las hembras. El primer par de patas se dirige hacia el aparato bucal y los otros tres se curvan hacia la parte posterior.

Las hembras tardan 5,8 días en desarrollarse completamente, mientras que los machos tardan más tiempo (6,6 días) en alcanzar el estado adulto (Ifantidis, 1990 citado por Rosenkranz y col., 2010; Donzè y Guerin, 1994; Martin, 1994). Las formas inmaduras anteriormente nombradas no pueden atravesar la superficie del cuerpo de la pupa de la abeja para succionar su hemolinfa y utilizan “una zona de alimentación”, que consiste en un único orificio localizado en la parte ventral del quinto segmento de la cutícula de la pupa que fue perforado por la hembra fundadora. Esto provoca la organización de los ácaros para alimentarse por turnos dentro de la celdilla (Donzè, 1995 citado por Garrido-Bailón, 2012).

Los machos alcanzan la madurez sexual antes que las hembras y se localizan en el lugar de acumulación fecal hasta que la primera hembra llegue al estado adulto. La reproducción sólo se puede producir en el interior de la celda de cría, por ello los machos comienzan a aparearse tan pronto como se desarrolle la primera hembra (Donzè y col., 1996) y a continuación fecundarán a las demás hembras a medida que vayan llegando al lugar de acumulación fecal. Tras varios apareamientos, las hembras conservan el esperma en una estructura denominada espermateca, la cual puede llegar a albergar hasta 35 espermatozoides (Donzè y Guerin, 1994; Donzè y col., 1996). Después de la cópula el macho muere, al igual que las hembras inmaduras, cuando nace la abeja adulta y son eliminados en las tareas de limpieza de la celda realizadas por las abejas nodrizas. Cuando la obrera o zángano han completado su desarrollo, emergen de la celda de cría conjuntamente con una o dos hembras de varroa que pueden recomenzar el ciclo. Estas hembras que surgen de la celda, fecundadas o no, abandonan rápidamente a su hospedador para colocarse sobre abejas de dos o más días de edad (Kraus, 1993; Kuenen y Calderone, 1997).

La longevidad de las hembras del parásito varía según la estación del año, siendo de 2-3 meses en verano y de 4-6 meses en invierno (Sammataro y col., 2000).

4.1.1.2. Epidemiología de la varroosis

La evolución paralela a lo largo del tiempo entre varroa y su hospedador original (*A. cerana*) ha hecho que este ácaro solo pueda reproducirse en las celdas de zánganos (Anderson, 2000), ya que las abejas se han adaptado a él hasta el punto de ser capaces de detectar y eliminar los ácaros en las celdillas de obrera y de detectar rápidamente crías de zángano muertas por la presencia simultánea de varias hembras de varroa en la celda, disminuyendo así la cantidad de ácaros viables en la colmena. En cambio, *Apis mellifera* al no haber coevolucionado tanto tiempo con este ácaro no ha perfeccionado aún esos mecanismos de rápida detección del parásito y, por ello, varroa aparece parasitando tanto la cría de obreras como de zángano en la abeja europea e incluso es capaz de producir un olor muy parecido al de su hospedador y adaptarlo a sus distintos estados de vida para no ser reconocido por las abejas obreras

(Kather y col., 2015). Aunque la repercusión patológica del ácaro en *Apis mellifera* depende de la fertilidad y fecundidad del ácaro en cada tipo de casta infectada (Martin, 1994; 1995).

La fertilidad del ácaro puede verse influida por un lado, por la cantidad de hembras del ácaro que no consiguen poner huevos en las celdas de cría y que varía en función de la especie hospedadora (Fries y col., 1994; Rosenkranz, 1999); y, por otro lado, por la mortalidad de la descendencia de la cría según las condiciones climáticas de la zona y época del año (Ifantidis y col., 1999; Mondragón y col., 2005, 2006).

La reproducción de *Varroa destructor* está fuertemente ligada a la presencia de la cría de abeja, ya que únicamente es capaz de reproducirse dentro de las celdas operculadas. En consecuencia, cuanto más largo sea el período de cría de la colonia, más numerosa será la descendencia (Fuchs y Langenbach, 1989).

En invierno, mientras no hay cría en las colonias de abejas, las hembras adultas del ácaro se refugian ventrolateralmente entre los terguitos tercero y cuarto de las abejas adultas, cerca del ventrículo donde se encuentra una hemolinfa con mayor cantidad de nutrientes. Las hembras que superaron el invierno de esta manera son las responsables de la continuación de la infección en primavera (Bowen-Walker y col., 1997). Estas hembras tienden a parasitar las celdas de zángano frente a las celdas de obrera (Fuchs y Langenbach, 1989), puesto que las primeras presentan celdas de mayor tamaño, un desarrollo más largo y existe una mayor cantidad de lípidos en las larvas de zánganos (Trouiller y col., 1994; Le Conte y col., 1989; Calderone y Lin, 2001 citado por Dietemann y col., 2013).

La diseminación del parásito puede ocurrir de varias formas y a distintos niveles. Entre colmenas de un mismo apiario la dispersión del patógeno puede verse favorecida por: la deriva de obreras pecoreadoras que entran equivocadamente a otra colmena en su regreso, la presencia de zánganos que tienen entrada libre en la colmena, el pillaje, la colocación de colmenas muy próximas entre sí, el intercambio de cuadros con cría parasitada, la trashumancia y el comercio de colonias parasitadas. La diseminación entre distintos colmenares puede ocurrir por la visita de zánganos de colmenas infestadas, por abejas extraviadas, pillaje, por la introducción de reinas afectadas o incluso mediante enjambres silvestres (Wilde y col., 2005).

Respecto a la distribución, el haplogrupo de *V. destructor* más frecuente de los dos es el coreano (Anderson y Trueman, 2000), se caracteriza por ser más lesivo para las abejas (De Guzmán y Rinderer, 1999), siendo capaz de desarrollar mecanismos de resistencia a los acaricidas empleados para el tratamiento de las colonias infectadas (Anderson y Trueman, 2000). Los ácaros que pertenecen al haplogrupo coreano son los más extendidos a nivel mundial y aparecen en Europa, Oriente Medio, África, Asia, América y Nueva Zelanda. Mientras que los ácaros del haplogrupo japonés sólo se

encuentran en Tailandia, Japón y América (Anderson y Trueman, 2000; Warrit y col., 2006). En la actualidad, *V. destructor* es casi cosmopolita, con la excepción de una isla de Canadá (Shutler y col., 2014) y Australia que es el único país donde las poblaciones de *A. mellifera* están libres de varroa (OIE, 2010).

La varroosis es una de las enfermedades recogidas por la OIE (2015), mientras que no está presente en el anexo I del RD 526/2014.

4.1.1.3. Patología de la varroosis

Varroa destructor puede ejercer su acción patógena de forma individual sobre la abeja adulta y su cría o sobre la colonia de abejas.

4.1.1.3.a. Signos clínicos en las abejas

Varroa afecta de manera mayoritaria a las fases de larva y pupa de la abeja, llegando a provocar la muerte de algunas crías infestadas que suelen encontrarse en fase de pupa. Aunque la pupa muera, el ácaro permanecerá en la celda hasta ser eliminado por las abejas adultas.

Por lo general, las abejas infestadas con varroa durante su desarrollo suelen sobrevivir al nacimiento, pero pueden surgir como adultos con signos de daño físico o fisiológico. Estos daños se deben principalmente a un descenso en la cantidad de proteínas durante la metamorfosis mientras el ácaro se alimenta de su hemolinfa (De Jong y col., 1982 citado por OIE, 2008a) y se traducen en una vida más corta, peso reducido, alas atrofiadas y deformes asociados a una reducida habilidad para volar (Ruano y col., 1991), y una menor resistencia natural frente a las infecciones (Yang y Cox-Foster, 2007).

El efecto del ácaro sobre las abejas adultas es menor, ya que las emplean principalmente como medio de transporte y suelen presentar niveles de parasitación más bajos que en la cría. Aunque si se han observado algunas alteraciones como la reducción en el tamaño de las glándulas hipofaríngeas (Schneider y Drescher, 1987) y modificaciones del comportamiento, que afectan sobre todo a la actividad del vuelo y la orientación (Kralj y col., 2007; Kralj y Fuchs, 2010).

4.1.1.3.b. Papel vectorial de varroa

Varios estudios han demostrado la capacidad de varroa para actuar como vehículo de diferentes agentes patógenos, fundamentalmente virus como el virus de las alas deformadas (Dainat y col., 2012) y los virus kashmir, parálisis aguda y su variedad israelí que están estrechamente emparentados y constituyen el complejo ABPV-KBV-IAPV según sus siglas (Francis y Kryger, 2012), así como para interferir en la respuesta inmunitaria de las abejas frente a estos agentes. No obstante, la mayoría de

los virus que infectan a las abejas se encuentran a un nivel muy bajo y de forma natural en las poblaciones de abejas sin causarles un daño significativo. Sin embargo, cuando varroa se alimenta puede actuar como vector favoreciendo la propagación de los virus (Ravoet y col., 2015a) y activando las infecciones de virus latentes mediante la inyección de proteínas salivares que afectan a la inmunosupresión de la abeja (Yang y Cox-Foster, 2005) y provocan signos clínicos de enfermedad (Tentcheva y col., 2004a), reduciendo la vida útil de las abejas. En cuanto a la deformidad encontrada en las alas de las abejas, se ha relacionado con la presencia del virus de las alas deformadas (Chen y col., 2005a; 2006; Yang y Cox-Foster, 2007; Boecking y Genersch, 2008; Dainat y Neumann, 2013; Rasolofoarivao y col., 2013), que es inoculado por varroa.

Además, varroa también puede empeorar los efectos nocivos de otras enfermedades comunes de las abejas, tales como la acarapisosis, causada por el ácaro *Acarapis woodi*.

4.1.1.3.c. Signos clínicos en la colonia

Cuando una colonia está parasitada por un reducido número de ácaros varroa no suele detectarse ningún daño aparente. Sin embargo, cuando el nivel de infestación se eleva, el riesgo de encontrar daños perjudiciales en la colonia también se eleva y dará lugar a un daño irreversible de la colonia, afectando a la forma física y reduciendo la capacidad reproductiva de las colonias (Duay y col., 2002; Fries y col., 2003; Villa y col., 2008).

En aquellas colonias donde la enfermedad no esté bien controlada, comenzaran a observarse rápidamente daños en toda la colonia, ya que una infestación severa ralentiza la sustitución de las abejas viejas por abejas jóvenes sanas debido a una mayor mortalidad de las crías. En esta situación, disminuyen: la recogida de alimento, los cuidados de la cría, la cantidad de cría, la vida media de las abejas, la puesta de la reina y las defensas de la colonia; por todo ello, la organización social de la colonia comienza a deteriorarse acompañada de pérdidas en la producción, hasta llegar a un proceso conocido como colapso de la colonia (Dainat y col., 2012; Becher y col., 2014).

El colapso de la colonia suele ocurrir rápidamente, durando sólo unas pocas semanas, en cualquier momento del año y puede afectar incluso a las colonias más fuertes que no presentaban signos visibles de la enfermedad. Los signos del colapso suelen ser: una repentina disminución de la población de abejas adultas sin muchos cadáveres alrededor, abejas con alas y abdómenes deformados, presencia de numerosos ácaros en las pupas de obreras y zánganos y sobre el fondo de la colmena, además de varias anomalías en los cuadros de cría, como por ejemplo: áreas vacías en la cría, patrón escaso de cría, celdas con cría “emergente” muerta y descuidada a menudo de color marrón claro y eliminados parcialmente por las abejas.

Las crías de abejas con ácaros se mueven más dentro de su celda, lo cual estimula su eliminación por parte de las abejas nodrizas. La reina pondrá otro huevo en estas celdas vacías y esto originará una puesta irregular en el cuadro de cría que no debe confundirse con síntomas similares como los encontrados en la loque americana con cría salteada.

La varroosis puede ser considerada como una enfermedad asintomática hasta que una tercera parte de la colonia se ve afectada (Popa, 1985); suele pasar desapercibida puesto que la localización de los ácaros en el interior de las celdas o entre los segmentos de las abejas no facilita su visualización directa.

4.1.1.4. Diagnóstico de la varroosis

Varroa destructor es un ácaro que puede ser detectado a simple vista; los métodos que recomienda la OIE (2008a) para su diagnóstico son los siguientes:

1. Examen de las abejas

Este método consiste en la extracción de 200-250 abejas adultas de cuadros de cría no operculada. Las muestras deben tomarse de dos a tres cuadros distintos y en ambos lados de los mismos. Las abejas se introducen en un contenedor especial y se les añade alcohol hasta que queden sumergidas. Posteriormente se agitan 10 minutos y las abejas se separan de los ácaros con la ayuda de un tamiz de 2-3 mm de malla para su posterior identificación.

Para cuantificar el número de ácaros en la muestra, Llorente (1993) propuso la utilización de un contador digital de colonias bacterianas que permite la agilización del recuento.

2. Examen de la cría

Se realiza sobre las celdas con cría de zángano o, en su ausencia, sobre la cría de obreras. Se utiliza un cuchillo para abrir las celdas operculadas, se retiran las larvas y a continuación se lavan las celdillas y se emplea un tamiz para la recogida de los ácaros, que serán colocados sobre una lámina para su recuento e identificación. Los ácaros también pueden verse adheridos en el fondo de las celdillas o sobre la cría de abeja.

3. Examen de los fondos de colmena

Este método se basa en la colocación de una bandeja o cartulina con vaselina, durante 1 o 2 días, en el fondo de la colmena para recoger los ácaros muertos por causas fisiológicas o como consecuencia del comportamiento de limpieza de las abejas.

Para favorecer la eficacia del diagnóstico se recomienda la utilización de algún tratamiento acaricida en la colonia de abejas, ya que aumentará la cantidad de ácaros recogidos con este sistema.

En caso de que hubiese muchos detritus en el fondo de la colmena, existen técnicas de flotación que pueden realizarse en el laboratorio (Brem, 1980 citado por OIE, 2008a).

4. Examen de las deyecciones

Consiste en la colocación de una plancha cubierta de grasa o vaselina en el fondo de la colmena infectada, con una malla perforada para examinar las deyecciones producidas por las abejas parasitadas. Al final de la temporada esas deyecciones solo contienen ácaros visibles. Aunque se pueden emplear técnicas de flotación para el estudio de grandes cantidades de deyecciones en el laboratorio.

Sobre estas planchas también se pueden observar las deyecciones de los ácaros, las cuales presentan gran cantidad de guanina y son de color blanco amarillento (Erickson y col., 1994, citado por Mozes-Koch y Gerson, 1997). La aparición de pequeñas manchas blancas en las paredes de las celdillas que tuvieron cría indica la presencia del parásito.

5. Identificación molecular del haplotipo

Para analizar el haplotipo de *V. destructor* se realiza una reacción de PCR-RFLP en la región del gen COI con la adición posterior de dos enzimas de restricción denominadas *XhoI* y *SacI* (Anderson y Fuchs, 1998).

6. Diagnóstico diferencial

En algunos casos, el ácaro varroa puede confundirse con otros parásitos, que ejercen daños similares a las abejas, como son por ejemplo *Braula coeca* y *Tropilaelaps* spp.

Braula coeca Nitzsch es un díptero áptero perteneciente a la familia *Braulidae*. Debido a su apariencia externa se le denomina erróneamente “piojo de la abeja”, no obstante en realidad se trata de una mosca con alas atrofiadas. Respecto a su morfología *Braula* es redondo, no ovalado, posee tres pares de patas y su tamaño es ligeramente más pequeño que el de *V. destructor*. Este insecto vive sobre el cuerpo de las abejas melíferas o los abejorros y actúa como comensal, robándoles el alimento de la boca. Aunque aparece en todas las castas, tiene especial predilección por la reina ya que ésta recibe el alimento de mayor calidad. Normalmente se localizan en la parte dorsal del tórax de las abejas adultas y sobre éstas el díptero adulto no ejerce daños graves, en cambio la fase más lesiva son sus larvas, las cuales realizan túneles que destruyen las celdas donde se almacena la miel.

Otros ácaros que parasitan a las colonias de abejas están incluidos en el género *Tropilaelaps*, dentro de la familia *Lelapidae*. Morfológicamente son ácaros alargados de color marrón rojizo y que se desplazan velozmente entre los cuadros. Afectan a las crías de las abejas melíferas causando malformaciones e incluso la muerte, puesto que se alimentan de la hemolinfa tanto de las larvas como de las ninfas y esto se traduce en la presencia de abejas adultas con alas y patas deformadas (Sammataro y col., 2000) que se arrastran por la entrada de la colmena (Atwal y Goyal, 1971 citado por OIE, 2008e). En un principio se pensaba que este género estaba constituido por dos especies: *Tropilaelaps clarae* y *Tropilaelaps koenigerum* (Delfinado-Baker y Baker, 1982a). Sin embargo, recientemente el análisis molecular de sus secuencias ha demostrado que existen dos especies más que deben ser añadidas al mismo género, y son: *Tropilaelaps mercedesae* y *Tropilaelaps thaii* (Anderson y Morgan, 2007).

Es importante tener en cuenta que la tropilaelapsosis se trata de una enfermedad de declaración obligatoria en la UE según el anexo I del RD 526/2014 y la OIE (2015). Los métodos de diagnóstico recomendados por la OIE (2008a) se basan precisamente en la identificación del agente etiológico y el diagnóstico diferencial con *V. destructor*.

4.1.1.5. Tratamiento y control de la varroosis

El RD 608/2006 se encarga de regular el Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas melíferas en España y establece la obligatoriedad de realizar, como mínimo, un tratamiento frente a la varroosis cada año mediante el uso de un producto veterinario entre los meses de septiembre a noviembre. Para facilitar su cumplimiento, el Plan Apícola Nacional ofrece ayudas económicas a los apicultores. Del mismo modo, es aconsejable la realización de un segundo tratamiento en primavera siguiendo estas mismas directrices.

En la actualidad existe una amplia cantidad de sustancias químicas y naturales denominados “varroacidas” para la lucha contra el ácaro *V. destructor*, así como diversos “métodos biotécnicos” (técnicas de manejo y métodos biológicos), que ayudan a controlar esta infestación en las colonias y poder mantener el número de ácaros por debajo de los niveles nocivos (Dietemann y col., 2012). Aunque este organismo no puede ser completamente erradicado en las colmenas, gracias a esta gran disponibilidad de medios de control los apicultores pueden conservar con éxito la productividad de sus abejas a pesar de la presencia del ácaro (Dietemann y col., 2013). La combinación de sustancias varroacidas y los métodos biotécnicos es más eficaz si se emplea en distintos momentos del año y dependiendo del nivel de parasitación, esto se conoce como “manejo integrado de plagas”.

Dentro de los compuestos con acción acaricida frente a la varroosis, aquellos que están autorizados para uso veterinario aparecen en la siguiente tabla (extraído de

AEMPS, 2014 <http://www.aemps.gob.es/medicamentosVeterinarios/Med-Vet-autorizados/Med-abejas/home.htm>) organizados por familias (Tabla 2).

Tabla 2.- Medicamentos veterinarios autorizados por la AEMPS para el tratamiento de la varroosis en abejas

Medicamento	Principio activo	Familia
Ácido fórmico®	Ácido fórmico	Ácido orgánico
Apiguard®	Timol	Aceite esencial
Apistan®	Tau fluvalinato	Piretroide
Apitraz®	Amitraz	Amidina
Apivar®	Amitraz	Amidina
Amicel varroa®	Amitraz	Amidina
Bayvarol®	Flumetrina	Piretroide
Checkmite®	Cumafós	Organofosforado
Ecoxal®	Ácido oxálico	Ácido orgánico
Thymovar®	Timol	Aceite esencial

El cumafós y el amitraz son los medicamentos más utilizados por los apicultores desde el año 2011. Se aplican mediante la colocación de unas tiras de plástico impregnadas con el compuesto varroacida entre los cuadros de la colmena. Las abejas adultas se impregnan con el compuesto y así entran en contacto con las varroas foréticas que se encuentran sobre ellas (Burgett y Kitprasert, 1990 citado por OIE, 2008a). El tratamiento se realiza en primavera, y si fuera necesario, siempre que no haya floración, se repite en otoño. Estos compuestos han sustituido a los piretroides para evitar los problemas de resistencia a varroa asociados al fluvalinato y la flumetrina.

Cada compuesto varroacida incluye unas instrucciones de uso para poder ser aplicado adecuadamente, a pesar de ello y durante muchos años los apicultores han utilizado los mismos principios activos de un modo artesanal, con dosis y duraciones del tratamiento no controladas por un veterinario. Al someter a los ácaros a dosis inadecuadas durante largos períodos de tiempo se produce el desarrollo de resistencias por parte del ácaro (Gerson y col., 1991), y, como consecuencia, estos tratamientos resultan ineficaces y se hace necesaria la búsqueda de nuevas sustancias para combatirlos, además de la posible permanencia de esos residuos en los productos de la colmena.

De hecho, ya se han descrito resistencias a algunos piretroides como es el caso del fluvalinato en varios países mediterráneos como Italia (Lodesani y col., 1995; Milani, 1995), Francia (Colin y col., 1997) y España (Higes y col., 1998). También se han detectado resistencias a otros tipos de compuestos como el cumafós (Spreafico y col., 2001) y al amitraz (Milani, 1999; Mathieu y Faucon, 2000; Elzen y col., 2000;

Rodríguez-Dehaibes y col., 2005) con una gran repercusión, puesto que se trata de nuevas moléculas sintetizadas para ser utilizadas como alternativa al fluvalinato.

Los ácidos orgánicos (ácido fórmico, oxálico, láctico) y los aceites esenciales (timol, mentol, eucaliptol) son productos alternativos que pueden utilizarse para el control de los ácaros *V. destructor*. Estas sustancias se pueden utilizar en la apicultura ecológica puesto que se encuentran de forma natural en la miel y por ello se reduce el riesgo de dejar residuos en la misma (Ritter, 2001; Medina y May, 2005), además su coste es menor en comparación con otros medicamentos veterinarios.

Los tratamientos químicos para el control de *V. destructor* son más eficaces cuando el ácaro se encuentra en la fase forética, debido a que está en contacto directo con los ingredientes activos. En cambio los métodos biológicos son más eficaces en la etapa reproductiva del ácaro.

Los métodos biotécnicos se basan en un profundo conocimiento del manejo de la colonia, son compatibles con la práctica de la apicultura ecológica, y su objetivo es detener el ciclo biológico del parásito para que la carga parasitaria no aumente hasta niveles que comprometan la salud de las abejas. Algunos de estos métodos son:

- Tratamiento térmico: Consiste en exponer a la colonia de abejas a temperaturas superiores a los 38°C para reducir la supervivencia de las varroas. El inconveniente que presenta esta técnica es que el umbral térmico de la cría es similar al del ácaro (44-45°C y 42°C durante dos días) y podría repercutir sobre la colonia de abejas (Engels y Rosenkranz, 1992).
- Cría de zánganos: se aprovecha la atracción química del ácaro por las larvas de zángano. La cría de zánganos es más atractiva para el ácaro en comparación con la cría de obreras debido al mayor espacio de la celda y a la duración del período de operculación, así como por la mayor producción de ácidos volátiles y durante más tiempo que las larvas de obrera (Le Conte y col., 1989; Calderone y Lin, 2001 citado por Dietemann y col., 2013). Para llevar a cabo esta técnica se introducen cuadros con cera estampada para zánganos en la parte central de la colmena, y cuando las celdas han sido operculadas por las obreras, se retiran los cuadros y se destruyen (Imdorf y col., 1996 citado por Rosenkranz y col., 2010) lejos del colmenar para evitar una posible reinfestación.
- Utilización de cuadros trampa: mediante el uso de excluidores se confina a la reina en un cuadro vacío (Maul y col., 1988 citado por Garrido-Bailón, 2012) que se mantiene en la colonia hasta que lo completa y todo quede operculado, forzando la entrada de varroas en el mismo cuadro. Finalmente ese panal es retirado de la colmena con las varroas en su interior (Lodesani y col., 2014).
- Espolvoreo de sustancia inertes como polvo inerte (Ramírez, 1994 citado por Fakimzadeh, 2001), harina (Loglio y Pinessi, 1993 citado por Fakimzadeh, 2001) o

azúcar en polvo (Fakhimzadeh, 2000; 2001) sobre la colonia de abejas. Se cree que el efecto principal de estas sustancias es la pérdida de adherencia de las ventosas tarsales de las varroas evitando que puedan fijarse a las abejas y además estimula su instinto de limpieza.

- Otra medida que se puede tomar es la selección de razas de abejas resistentes a *V. destructor* basadas en el comportamiento higiénico mediado por señales olfatorias (Rinderer y col., 2014; Guarna y col., 2015). Ya que éste se considera el mecanismo en el que se basa la resistencia de las abejas melíferas a una serie de enfermedades (Rothenbuhler, 1964; Spivak y Gilliam, 1993; Spivak y Reuter, 2001) y se define como la habilidad para detectar y extraer cría enferma o parasitada. Este comportamiento está determinado por varios genes recesivos, por ello esta conducta es poco frecuente en las poblaciones naturales de abejas. Incluso se puede inducir este tipo de comportamiento aplicando estímulos adecuados en aquellas líneas de abejas con un reducido comportamiento higiénico. Se ha demostrado que aquellas colmenas genéticamente seleccionadas para tener una buena higiene son capaces de eliminar las larvas parasitadas y de controlar la varroosis, con una mayor producción final de miel que en las colmenas comerciales no seleccionadas para este carácter (Spivak y Reuter, 1998).

4.1.2. Acarapisosis (agente *Acarapis woodi*)

4.1.2.1. Etiología de la acarapisosis

La acarapisosis o acariosis es una patología de *A. mellifera* y de otras abejas del género *Apis* causada por el ácaro *Acarapis woodi* (Rennie y col., 1921 citado por Sammataro y col., 2013) o también denominado ácaro traqueal. Este ácaro pertenece al filo Artropoda, clase Arachnida, superorden Acariformes, orden Trombidiformes, familia Tarsonemidae (Krantz y Walter, 2009) y es un endoparásito obligado de la abeja melífera, debido a que se alimenta y reproduce dentro de las tráqueas de las abejas adultas (Rennie y col., 1921 citado por Sammataro y col., 2013; Delfinado-Baker y Baker, 1982b).

El género *Acarapis* se compone por tres especies de ácaros específicos de *Apis mellifera*: *A. woodi*, *A. dorsalis* y *A. externus*. Son morfológicamente muy similares y se diferencian principalmente por su ubicación en la abeja hospedadora (Webster y Delaplane, 2001), ya que el primero es un parásito interno de las tráqueas y los otros dos aparentemente no son patógenos y se encuentran sobre la superficie externa de la abeja. *Acarapis externus* (Morgenthaler, 1931) se localiza en el cérvix (región del cuello) entre la cabeza y el tórax; y *A. dorsalis* (Morgenthaler, 1931) aparece habitualmente en el surco dorsal del tórax, entre las alas (Delfinado-Baker y Baker, 1982b). Una cuarta especie de ácaro externo, *A. vagans* Schneider fue encontrado en centro Europa y Nueva Zelanda, generalmente se localiza en la parte basal del ala

posterior de los abejorros (Lindquist, 1986). Sin embargo, otros investigadores consideran que esta especie debe tratarse como un “taxón dudoso” aunque este problema todavía no se ha resuelto (Delfinado-Baker and Baker, 1982b; Lindquist, 1986). Incluso otros trabajos muestran la existencia de serias dudas sobre la clasificación de *A. woodi* (Garrido-Bailón y col., 2012; Cepero y col., 2015a).

Rennie, en 1921 (citado por Sammataro y col., 2013), describió por primera vez este ácaro en la abeja occidental europea *Apis mellifera* L., asociado con la elevada mortandad de colonias de abejas que se produjo de forma repentina y sin causa aparente en la Isla de Wight (Reino Unido) entre los años 1904 y 1919, conocida como “enfermedad de la Isla de Wight” (Adam, 1968). Inicialmente el ácaro fue identificado con el nombre de *Tarsonemus woodi* (Rennie y col., 1921 citado por Sammataro y col., 2013), después fue renombrado como *Acarapis woodi* (latín: *acar*=ácaro; *apis*=abeja) o ácaro traqueal por Hirst (1921); aunque el hecho de que este ácaro fuese el causante de la “enfermedad de la isla de Wight” nunca fue confirmado (Baley, 1964; Bailey y Perry, 2001).

Acarapis woodi es un ácaro con cuatro pares de patas y un cuerpo compuesto por dos partes denominadas gnatosoma e idiosoma, que a su vez está dividido en podosoma (parte anterior) y opistosoma (parte posterior). El gnatosoma está formado por la boca, los palpos y los quelíceros, que permiten la aspiración de la hemolinfa durante la alimentación. Ventralmente, los adultos tienen un apodema anterior formando una unión en forma de Y con el apodema proesternal. Todos los ácaros traqueales son de un color blanco brillante. Los ácaros inmaduros tienen 3 pares de patas y son más grandes que las hembras adultas (Delfinado-Baker y Baker, 1982b; Lindquist, 1986; Ochoa y col., 2005).

Este ácaro presenta dimorfismo sexual, siendo el macho de menor tamaño que la hembra. La hembra adulta de *A. woodi* tiene un cuerpo piriforme con un tamaño de 120-190 x 77-80 μm y se distingue del macho porque presenta 5 setas en la pata IV. El tamaño de los machos es 125-136 x 60-77 μm y su pata IV carece de todas las estructuras del tarso. En general, las patas de los machos son más largas que las de la hembra, siendo las del primer par más robustas que el resto (Delfinado-Baker y Baker, 1982b). Ambos sexos presentan un cuerpo cubierto de pelos cortos o setas excepto en el área prodorsal y una serie de protuberancias táctiles alargadas en el dorso, que le sirven al ácaro para localizar los espiráculos de las abejas y trasladarse por su cuerpo (Sammataro y Needham, 1996).

Otros ácaros incluidos en la familia Tarsonemidae han sido hallados en asociación con *Apis cerana* y *Apis mellifera*, son: *Pseudacarapis indioapis*, descrito por Lindquist (1986), y *Pseudacarapis trispicula*, descubierto por Ochoa y col. (2003), que fue detectado recientemente en Vanuatu (Oceanía) y en China.

El ciclo de vida de *A. woodi* está compuesto por las fases de huevo, larva, ninfa y adulto. La etapa de ninfa se encuentra dentro de la piel de las larvas. Los machos completan su desarrollo en 11 ó 12 días, mientras que las hembras tardan de 14 a 15 días (De Jong y col., 1982 citado por Bailey y Ball, 1991; Royce y col., 1988; Baley y Ball, 1991; Pettis y Wilson, 1996; Sammataro y Needham, 1996). Tanto las larvas como los adultos de *Acarapis* se alimentan de la hemolinfa de la abeja, que obtienen perforando las paredes de la tráquea y los sacos aéreos con la ayuda de los estiletes del gnatosoma (Hirschfelder y Sachs, 1952). A continuación presionan con la boca la herida producida y aspiran la hemolinfa hasta la faringe.

En general, todas las formas de vida del ácaro se desarrollan dentro de las tráqueas y están asociadas a los sacos aéreos, y solo durante un breve período las hembras fecundadas salen de la tráquea para buscar nuevos hospedadores, seleccionando las abejas con menos de cuatro días de edad (Phelan y col., 1991). Estas hembras evitan a las abejas de más edad durante el verano porque no van a vivir el tiempo suficiente para que los ácaros completen su ciclo de vida. Durante su dispersión, los ácaros son atraídos por la expulsión de aire del espiráculo protorácico y los hidrocarburos específicos de la cutícula de las abejas (Phelan y col., 1991; VanEngelsdorp y Otis, 2001a; McMullan y col., 2010). Los ácaros inmaduros pueden moverse dentro de la tráquea a través de las corrientes de aire producidas durante la respiración de la abeja (Ochoa y col., 2005).

Acarapis woodi puede esconderse bajo el lóbulo aplanado que cubre el primer espiráculo torácico de la abeja para acceder al tronco de la principal tráquea protorácica. La hembra fecundada se introduce en la abeja a través del primer par de espiráculos, dado que este orificio presenta un diámetro mayor que los demás y carece de cualquier tipo de cierre que dificulte su acceso. Al profundizar en el sistema traqueal, la hembra va midiendo las paredes de las ramas traqueales con las setas dorsal, ventral y la de la pata IV (Ochoa y col., 2005). Tras su entrada, el ácaro normalmente se coloca en las tráqueas torácicas y rara vez en los sacos aéreos torácicos y abdominales de las abejas con menos de cuatro días de vida. Transcurridos tres días desde la entrada de la hembra en la tráquea, ésta realiza la oviposición. Los huevos son 5-15 micras más largos que las hembras adultas (Sammataro y col, 2013). A continuación, el huevo tarda tres días en eclosionar y de él surge una larva hexápoda que se transformará en ninfa y finalmente en adulto. En el interior de los tubos traqueales, los machos se mueven buscando a las hembras ninfales a punto de mudar a la edad adulta y cuando las encuentran las custodian para asegurar el apareamiento (Ochoa y col., 2005).

Los ácaros adultos de *A. woodi* poseen un aparato bucal picador-chupador para atravesar la tráquea de la abeja y alimentarse de su hemolinfa (Hirschfelder y Sachs, 1952). El apareamiento ocurre en el interior de las tráqueas y únicamente las

hembras fecundadas saldrán al exterior para diseminar la enfermedad (Royce y col., 1988). Estas hembras llegarán al exterior a través del primer espiráculo torácico desde el cual se aferrarán a un pelo del tórax con una o ambas extremidades posteriores, a la espera de encontrar otra abeja a la cual se enganchará ayudándose con las extremidades anteriores. Posteriormente se desplazará hasta la región del primer espiráculo torácico, guiada por la vibración de las raíces de las alas y por el aire exhalado que sale de los espiráculos (Hirschfelder y Sachs, 1952).

4.1.2.2. Epidemiología de la acarapisosis

Las obreras constituyen el reservorio y hospedador principal de *A. woodi* por su abundancia durante todo el año. En cambio, se han encontrado más ácaros en los zánganos que en las obreras (Royce y Rossignol, 1991; Dawicke y col., 1992), probablemente por el mayor tamaño de sus troncos traqueales. También se han encontrado ácaros parasitando a las reinas. Camazine y col. (1998 citado por Sammataro y col., 2013) demostraron que las reinas parasitadas pesaban menos, e incluso aquellas que presentaron las tráqueas negras y completamente llenas de ácaros no manifestaron alteraciones en la puesta de huevos. *Acarapis woodi* puede encontrarse en otras localizaciones como los sacos de aire del abdomen y la cabeza de las abejas (Giordani, 1965 citado por OIE, 2008b), y externamente en la base de las alas de la abeja (Royce y Rossignol, 1991); aunque su efecto en estas áreas es desconocido. Además, se han llegado a encontrar huevos y hembras del ácaro en la base del ala del tórax de la abeja (Royce y col., 1988).

Los ácaros hembra se dispersan cuando la abeja hospedadora tiene entre 15-25 días de edad, utilizando las setas de la abeja para cambiar de hospedador (Pettis y Wilson, 1996); además, su tasa de dispersión aumenta durante la noche (Pettis y col., 1992). En la fase de dispersión los ácaros son muy vulnerables a la deshidratación y la inanición, y por ello su supervivencia está asociada a la temperatura ambiente y la humedad (Giordani, 1962 citado por Sammataro y col., 2013). Durante esta fase, los ácaros corren el riesgo de ser expulsados durante el vuelo de la abeja o durante el autocepillado (Sammataro y Needham, 1996; Sammataro y col., 2000); en el caso de no encontrar un nuevo hospedador morirían en pocas horas.

El genotipo de las abejas melíferas puede afectar a la diseminación del parásito ya que existen poblaciones de abejas resistentes a *A. woodi* (Lin y col., 1996; Danka y col., 1995 citado por Sammataro y col., 2013; Nasr y col., 2001; De Guzman y col., 2002, 2005; Villa y Danka, 2005; Villa y Rinderer, 2008). Otro factor que actúa sobre la capacidad de infección del ácaro es la ubicación de las colonias de abejas, ya que el calor también se asocia con la mortalidad del ácaro (Harbo, 1993). Este autor demostró que las colmenas expuestas al sol directo en Luisiana habían reducido la

infestación de ácaros, mientras que en la sombra aceleraron el crecimiento de sus poblaciones.

En las regiones templadas, las poblaciones de ácaros aumentan durante el invierno, cuando las abejas están agrupadas y confinadas en el interior de la colmena para soportar las duras condiciones invernales.

El primer registro de pérdida de colonias producido por *A. woodi* sucedió en el año 1984 en Texas (EE.UU). Desde ese momento este ácaro se extendió a todos los estados de los EE.UU. e incluso en la mayoría de las provincias canadienses. Su transmisión se vio favorecida por la práctica de la trashumancia de abejas para la polinización, por la venta de colonias de abejas infestadas de ácaros.

Desde entonces, los enjambres y la deriva de abejas infestadas, sumado a la distribución mundial de *A. mellifera* también han fomentado la expansión de este ácaro y, por ello, ha conseguido establecerse con éxito en lugares como Europa, Asia, algunas zonas de África, América del Norte y del Sur (Ellis y Munn, 2005), hasta ser considerado en algunos casos como un posible cofactor del síndrome de despoblamiento (Cepero y col., 2015a). Actualmente *A. woodi* no ha sido detectado en la Isla de Terranova de Canadá (Shutler y col., 2014), Australia, Nueva Zelanda o Escandinavia (Denmark y col., 2000 citado por Sammataro y col., 2013; Hoy, 2011 citado por Sammataro y col., 2013). Un trabajo de Kojima y col. (2011a) registró la presencia de *A. woodi* en las abejas asiáticas (*A. cerana japonica*), en Japón como consecuencia del comercio de abejas a nivel mundial.

Al igual que la varroosis, la acarapisosis es una de las enfermedades que deben ser comunicadas a la UE según las listas de la OIE (2015) aunque no aparece en el RD 526/2014, dado que por lo general la acarapisosis presenta bajas prevalencias en las colonias de abejas (Yang y col., 2013; Cepero y col., 2015a; Rinderer y col., 2014) y no suelen suponer un problema grave para la salud de las colonias de abejas.

4.1.2.3. Patología de la acarapisosis

Hoy en día, se desconocen las causas exactas de la muerte de las colonias parasitadas con *A. woodi*. Este problema se ve agravado por la falta de síntomas únicos asociados con la enfermedad que produce, los cuales solo se exteriorizan cuando la carga parasitaria es muy elevada.

Las tráqueas infectadas por ácaros pueden aparecer oscurecidas o presentar manchas irregulares debido a la acumulación de las deyecciones de los ácaros. Sus heces contienen guanina, la cual al contacto con el aire circulante de la tráquea se oxida y produce esa tonalidad negruzca. Si se acumula un gran número de individuos (larvas, ninfas y adultos) dentro de la tráquea, puede producirse una obstrucción mecánica de las vías respiratorias que dificulte o impida la respiración de las abejas,

llegando a matarlas por asfixia. La disminución del aporte de oxígeno producirá la atrofia de los músculos de las alas e impedirá volar a la abeja (Harrison y col., 2001). Esto, unido a la extracción de la hemolinfa por parte de los ácaros, dará como resultado el debilitamiento generalizado de la abeja, lo que favorecerá el contagio y la aparición de otras enfermedades. *Acarapis woodi* es capaz de actuar como vector de virus y bacterias contaminando la hemolinfa con su saliva mientras se alimenta (Scott-Dupree y col., 1995). Como resultado de la infección, la abeja parasitada no puede volar y se arrastra temblando sobre el terreno en las proximidades de la colmena. En este caso pueden encontrarse abejas con el abdomen más o menos distendido, con diarrea en algunos casos y con las alas perpendiculares al cuerpo en forma de cruz (OIE, 2008b). Es importante destacar que existen otras enfermedades con una sintomatología muy parecida.

El efecto que provoca la parasitación de *A. woodi* en las colonias de abejas se traduce en: reducción de la función muscular de vuelo (McMullan y Brown, 2009), poblaciones de abejas más pequeñas, reducción del área de cría, agrupaciones de abejas más débiles durante la invernada, incremento del consumo de miel, menor producción de miel, y habitualmente, pérdida de colonias (Komejli y col., 1989).

Una elevada carga parasitaria afecta al metabolismo de la abeja y altera la capacidad de la colonia para mantener la temperatura de la colmena (Skinner, 2000); por lo tanto el enfriamiento podría causar la muerte de la colonia. Aunque en el norte de EE.UU. y Canadá se ha observado que las colonias con niveles de infestación alrededor del 40-50% o mayores suelen morir durante el invierno (Furgala y col., 1989 citado por Sammataro y col., 2013). La probabilidad de que la colonia muera aumenta cuanto más bajas sean las temperaturas durante el invierno, independientemente del valor de prevalencia del ácaro.

4.1.2.4. Diagnóstico de la acarapisosis

Puesto que esta enfermedad carece de una sintomatología característica, su diagnóstico debe ser realizado en el laboratorio, para lo cual la OIE (2008b) recomienda una serie de técnicas descritas a continuación.

No es fácil detectar niveles muy bajos de la infestación y por ello se debe emplear un mínimo de 50 abejas para su análisis (Giordani, 1970 citado por OIE 2008b; Frazier y col., 2000). Asimismo, es importante tener en cuenta que las abejas de mayor edad (reinas, zánganos u obreras) poseen una mayor cantidad de ácaros.

1. Disección de las abejas

1.1. Preparación directa (Wilson y col., 1997 citado por OIE, 2008b)

Partiendo de una muestra de 50 abejas por colmena, se procede a separar el tórax de la cabeza de la abeja para poder observar las tráqueas torácicas así como las primeras ramas de las tráqueas mediante un microscopio. Si se apreciase melanización en una o ambas tráqueas o presencia de cuerpos ovales translúcidos como los huevos, el diagnóstico sería positivo puesto que las tráqueas sin parasitar son claras o blancas.

Para descartar posibles infestaciones leves se puede realizar un examen microscópico de las tráqueas a 100 aumentos para poder ver ácaros adultos o alguna de sus fases de desarrollo.

1.2. Maceración (Ritter, 1996 citado por OIE, 2008b)

Esta técnica es semejante a la anterior, salvo que en este caso el tórax se corta en finos discos y se le añade una solución de hidróxido potásico (KOH) para facilitar la observación del primer par de tráqueas bajo un microscopio.

2. Trituración con ácido láctico (Colin, 1979 citado por OIE, 2008b)

Se emplea ácido láctico sin diluir sobre un triturado de tórax con el fin de disolver las fibras musculares y mejorar la visualización al microscopio de la posible presencia de ácaros.

3. Tinción con azul de metileno (Peng y Nasr, 1985)

Este tipo de tinción colorea el ácaro pero no las tráqueas para facilitar su observación.

El último método y el anterior no permiten conocer la ubicación exacta del parásito en la abeja, por ello es necesario realizar un diagnóstico diferencial con *A. dorsalis* y *A. externus* en el microscopio, poniendo especial atención en la muesca de la placa coxal, el espacio entre los estigmas torácicos y la longitud del tarso en el cuarto par de patas ya que son los rasgos establecidos por Ritter (1996 citado por OIE, 2008b) para diferenciar las tres especies.

4. Métodos inmunológicos

Antiguamente se emplearon una serie de técnicas ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) basándose en las reacciones antígeno-anticuerpo (Grant y col., 1993; Ragsdale y Furgala; 1987; Ragsdale y Kjer, 1989).

5. Visualización de guanina

Mozes-Koch y Gerson (1997) describieron un método basado en la visualización bajo luz ultravioleta (UV) de la guanina procedente de las deyecciones de los ácaros a partir del macerado del tórax de las abejas.

6. Identificación molecular

A pesar de que todavía no hay un método molecular recomendado por la OIE (2008b), varios autores han desarrollado varias técnicas de PCR utilizando el gen mitocondrial COI (Evans y col., 2007; Kojima y col., 2011b) para identificar *A. woodi* a nivel de género (Garrido-Bailón y col., 2012) o de especie (Cepero y col., 2015a).

4.1.2.5. Tratamiento y control de la acarapisosis

Los tratamientos para el control de *A. woodi* deben utilizar materiales volátiles que sean letales únicamente para el parásito, incluyendo el uso de vapores de cristales de mentol colocados en un saco de malla sobre los cuadros (Giordani, 1977 citado por Sammataro y col., 2013; Frazier y col., 2000), el ácido fórmico (Underwood y Currie, 2009), timol o una mezcla de aceites vegetales (Rice y col., 2002), sustancias varroacidas como el amitraz (Apivar®) y tortas de aceite o grasa hechas con manteca vegetal y azúcar. Algunos de estos tratamientos también sirven para el control de *V. destructor* y, como se hizo con este ácaro, se han desarrollado líneas resistentes de abejas seleccionando las abejas que presenten aumentado su comportamiento higiénico (Lin y col., 1996; Pettis y Pankiw, 1998; Danka y Villa, 2005; Villa, 2006; De Guzman y col., 2002, 2005) para que algunas razas de abejas sean menos susceptibles a la infestación por *A. woodi*.

El cambio de reina puede alterar la resistencia de las colonias, dado que las nuevas crías pueden ser más o menos resistentes a los ácaros que las obreras descendientes de la reina anterior.

Desafortunadamente, *A. woodi* está eclipsado por el ácaro *V. destructor* y por ello no se investiga regularmente. Además, suelen aparecer en niveles muy bajos, tal vez debido al empleo de los tratamientos usados para controlar *V. destructor* (Dietemann y col., 2013).

Las técnicas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) descritas para varroa así como la ubicación del colmenar (VanEngelsdorp y Otis, 2001b), han tenido éxito en mantener a *A. woodi* bajo control; Sin embargo, actualmente no existen controles biológicos, aunque se ha observado que la enjambrazón reduce la densidad de ácaros en una colonia (Royce y col., 1991). Asimismo, se hace necesaria la implantación de controles permanentes en las aduanas con el fin de evitar la expansión de este parásito debida al comercio internacional de abejas y productos apícolas.

4.1.3. Nosemosis (agente *Nosema apis* y *N. ceranae*)

En la actualidad se han descrito dos especies dentro del género *Nosema* que parasitan a las abejas melíferas: denominadas *N. apis* y *N. ceranae*. *N. apis* (Zander, 1909 citado por OIE, 2013a) parasita principalmente a la abeja europea (*Apis mellifera*), mientras que el hospedador originario de *N. ceranae* (Fries y col., 1996) es la abeja asiática (*Apis cerana*), aunque ambos organismos pueden parasitar cualquiera de las dos especies de abejas (Paxton y col., 2007). Ambas especies de microsporidios producen una enfermedad que afecta a la viabilidad de las colmenas conocida como nosemosis; sin embargo, cada especie presenta un cuadro clínico muy diferente (COLOSS, 2009): nosemosis tipo A y tipo C, son producidas por *N. apis* y *N. ceranae* respectivamente.

4.1.3.1. Etiología de la nosemosis

Las especies del género *Nosema* son hongos unicelulares que pertenecen al supergrupo *Opisthokonta* (Adl y col., 2005), en el que se incluye la división Microsporidia puesto que en un principio fueron clasificados taxonómicamente dentro de los Protistas, aunque un estudio muy reciente vuelve a clasificarlos dentro de este grupo (Ruggiero y col., 2015). En ambos casos se trata de un parásito intracelular obligado muy especializado, que invade las células epiteliales del ventrículo (estómago) de las abejas adultas.

Tanto *N. apis* como *N. ceranae* producen esporas como formas de resistencia empleadas en la transmisión de la enfermedad. Estas esporas presentan rasgos morfológicos característicos de cada especie, lo cual permiten diferenciar ambos microsporidios. Las esporas de ambas especies son refringentes y de forma ovalada, pudiendo diferenciarse por su tamaño, ya que las esporas de *N. apis* (6 x 3 µm; Zander y Böttcher, 1984 citado por Fries y col., 2013) son aproximadamente 1 µm más largas que las de *N. ceranae* (4,7 x 2,7 µm; Fries y col., 1996). Al observar estas esporas al microscopio se distinguen dos membranas: la más externa (exospora) está formada por proteínas y no permite el paso de la luz, mientras que la capa interna (endospora) se compone de quitina y permite el paso de la luz; ambas capas les confieren resistencia frente a condiciones climáticas adversas. En la parte anterior de la espora, se distinguen dos estructuras: el disco de anclaje, donde comienza el tubo polar (más corto en *N. ceranae*), y el diplocarion rodeado por un filamento polar entre 20 y 23 vueltas en *N. ceranae* o con más de 30 vueltas en *N. apis* (Fries y col., 1996); también se aprecia una vacuola con material flocular en la parte posterior. Se denomina esporoplasma al material que envuelve ambas partes. Las abejas eliminan las esporas a través de las heces (Gilliam y Shimanuki, 1967).

Las abejas se infectan al ingerir esporas con el alimento (Bailey, 1981; Webster, 1993), en el agua (L'Arrivee, 1965 citado por Bailey y Ball, 1991), por la trofalaxia

(Webster, 1993) o después de la limpieza de la colmena y los pelos del cuerpo (Bulla, 1977 citado por OIE, 2013a; Fries, 1993; Webster, 1993). Ambos microsporidios invaden en primer lugar las células del epitelio de la parte posterior del ventrículo donde comenzarán a germinar (Bailey, 1955) cuando el casquete polar de las esporas sea digerido, debido al ambiente básico creado por los jugos gástricos. Transcurridas 2 semanas, la infección se habrá extendido por todo el epitelio. El mecanismo utilizado por estos parásitos para diseminar la infección se basa en la protusión del filamento polar de la espora en germinación. Dicho filamento atraviesa la membrana de una célula epitelial del ventrículo sin romperla y penetra en su citoplasma para introducir el esporoplasma binucleado (Larsson, 1986), el cual crecerá dentro de la célula ventricular. A continuación, se fusionarán los dos núcleos, convirtiéndose en meronte o célula madre, el cual, 24 horas después, se dividirá asexualmente formando los merontes; este proceso de división binaria se denomina merogonia. En *N. apis* se producen dos ciclos merogónicos, las esporas formadas en la primera generación se caracterizan por presentar una fina endospora y un filamento polar reducido; por el contrario, las esporas procedentes de la segunda generación tienen una endospora más gruesa y un filamento polar también más largo. Con el paso del tiempo los merontes se transforman en esporontes, y cada uno de ellos originará dos esporoblastos que al madurar se convertirán en esporas. En el caso de *N. apis*, las esporas maduras comienzan a producirse en grandes cantidades transcurridos tres días después de la infección, aunque esto ocurre aproximadamente un día después en el caso de *N. ceranae* (Forsgren y Fries, 2010). En los textos clásicos se indica que las células parasitadas con gran cantidad de esporas se romperán y estas esporas maduras serán liberadas a la luz del tubo digestivo, una vez allí podrán infectar a otras células epiteliales o serán expulsadas al exterior con las heces. Gracias a este mecanismo pueden producirse simultáneamente autoinfecciones y nuevas infecciones.

4.1.3.2. Epidemiología de la nosemosis

El contagio de las abejas adultas se produce a través de las esporas que expulsan con las heces las abejas infectadas. La nosemosis se transmite de unas abejas a otras de forma horizontal (Higes y col., 2009b) a través de varias vías de infección, de las cuales las más comunes son por la ingesta de esporas en el alimento o con el agua, cuando las obreras limpian los panales de heces infectadas (Paxton y col., 2007), o mediante trofalaxia entre abejas u entre colonias; aunque la acumulación de miel y las abejas muertas infectadas también pueden ayudar en la transmisión de la enfermedad. Probablemente, la contaminación fecal de la cera, concretamente en los panales utilizados para la cría, es la principal fuente de infección de *N. apis* (Bailey, 1955).

Tanto *N. apis* como *N. ceranae* son capaces de infectar a las tres castas de abejas adultas de la colonia (obreras, reinas y zánganos).

Por lo general, *Nosema* no supone un gran problema para las abejas; sin embargo, el nivel de parásitos en la colmena puede aumentar hasta el punto que la colonia sea incapaz de controlar la infección cuando las abejas no pueden salir al exterior de la colmena durante mucho tiempo, bien por unas condiciones climáticas desfavorables (frio o lluvia), o bien por la realización de trayectos largos durante la actividad trashumante, haciendo que las abejas se vean obligadas a defecar dentro de la colmena. Esto ocurre en otoño e invierno en los climas más fríos.

La tasa de multiplicación de ambos parásitos depende de la temperatura, ya que afecta a la viabilidad de las esporas, independientemente de donde se encuentren (Morgenthaler, 1939). Las esporas de *N. apis* pueden mantener su viabilidad durante más de un año en los excrementos (Bailey, 1962 citado por OIE, 2013a), más de 4 años y medio en los cadáveres de las abejas enfermas (Steche, 1985 citado por OIE, 2013a) y a lo largo de 4 meses sumergidas en miel (White, 1919 citado por OIE, 2013a) o solo 3 días a la temperatura de la colmena (Morgenthaler, 1939). Las esporas de *N. ceranae* también pueden estar presentes en la jalea real (Cox-Foster y col., 2007), en el polen corbicular (Higes y col., 2008a) y en las egagrópilas de los abejarucos (*Merops apiaster*) (Higes y col., 2008b; Valera y col., 2011). Un estudio (Higes y col., 2008b) demostró la viabilidad de las esporas de *N. ceranae* en egagrópilas de abejaruco mantenidas 18 días en condiciones ambientales, lo cual pone de manifiesto la elevada capacidad infectiva de este patógeno. Parece ser que las esporas de *N. ceranae* resisten mejor la desecación y el calor que las de *N. apis* (Fenoy y col., 2009; Martín-Hernández y col., 2009), y en cambio son más sensibles a las temperaturas de congelación (Forsgren y Fries, 2010). En primavera es cuando la enfermedad alcanza sus valores máximos debido al largo confinamiento invernal (Neira, 1994), al contagio de las obreras durante la preparación y limpieza de los panales antes de que la reina comience la puesta de huevos (Bailey, 1955), y a la exposición de un elevado porcentaje de las abejas a la temperatura de la cría, la cual es óptima para la multiplicación del parásito por lo menos en el caso de *N. apis* (Lotmar, 1943 citado por OIE, 2013a). La incidencia de la enfermedad se reduce mucho en los meses de verano y puede observarse un ligero aumento hacia el otoño, pudiendo verse afectada también en situaciones de estrés de la colonia.

Dadant (1975) demostró que la magnitud de la enfermedad depende no solo de la colonia o los colmenares sino también de las zonas geográficas, y que la virulencia de la enfermedad puede cambiar de un año a otro, alcanzando su pico máximo cuando la colmena mostró una baja producción de miel el verano anterior. Por el contrario, en la lucha contra el parásito, Steche (1985 citado por OIE, 2013a) dio más importancia al tamaño de la colonia y a las condiciones climáticas previas a la invernada. Su hipótesis consistió en que disminuiría la esperanza de vida de toda la colonia si las condiciones al comienzo del otoño eran desfavorables, lo cual provocaría numerosas muertes de abejas durante el invierno o al empezar la primavera.

La nosemosis causa una reducción de cría de abejas, menos entrada de alimento en la colmena y menor producción de miel, produciéndose por tanto importantes pérdidas económicas (Anderson y Giacon, 1992).

Algunos autores (Bayley y Ball 1991; Benjeddou y col., 2001), han asociado a *Nosema* con la presencia de algunos virus (virus de las realeras negras, virus filamentoso y el “virus Y” de abejas) pero hoy en día los mecanismos de asociación siguen sin estar claros, aunque parece existir un efecto sinérgico entre *N. ceranae* y DWV que depende de la dosis y el tipo de nutrición (Zheng y col., 2015). Una de las hipótesis consiste en que *Nosema* podría interferir con los mecanismos de resistencia antivirales (Bayley y Ball 1991).

Por su elevada prevalencia a nivel mundial (Klee y col., 2007; Chen y col., 2008; Giersch y col., 2009; Yoshiyama y Kimura, 2011; Martín-Hernández y col., 2012; Gómez-Moracho y col., 2015; Emsen y col., 2015) y su efecto sobre las colonias de abejas, a las que puede llegar a colapsar (Higes y col., 2008c; 2009a; Bekele y col., 2015; Betti y col., 2014; Wolf y col., 2014), es cuestionable que desde el año 2014 las nosemosis no aparezcan incluidas en la lista de enfermedades de la OIE (2015) ni en el nuevo Real Decreto (RD 526/2014) que sustituye al RD 617/2007 donde la nosemosis se encontraba en la lista C del anexo I, habiendo estado incluidas a finales del pasado siglo.

La nosemosis tipo A, producida por *N. apis*, es una de las enfermedades más extendidas de las abejas (Nixon, 1982), aunque no abunda en las áreas tropicales y subtropicales (Wilson y Nunamaker, 1983).

Nosema ceranae se ha encontrado en varias poblaciones de abejas europeas geográficamente separadas en Europa, Sudamérica, Norteamérica y Asia, específicamente en países como Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Serbia, España, Suecia y Suiza. Aunque este microsporidio fue descrito en la abeja europea hace tan solo una década (Higes y col., 2006, 2013a; Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Paxton y col., 2007; Botías y col., 2012a), esto demuestra que se ha extendido muy rápidamente a nivel mundial (Budge, 2008; Gómez-Moracho y col., 2015). Por ello, se creó un grupo de especialistas, pertenecientes a 40 países diferentes, que han realizado numerosos estudios sobre este patógeno y su papel en la pérdida de colonias de abejas, este grupo se conoce con el nombre de COLOSS (<http://www.coloss.org/>).

4.1.3.3. Patología de la nosemosis

Estas dos especies del género *Nosema* producen enfermedades diferentes: nosemosis tipo A (*N. apis*) y tipo C (*N. ceranae*) (Higes y col., 2010b). La especie *N.*

ceranae ha sido relacionada con el fenómeno de despoblamiento y colapso de las colonias de abejas (Higes y col., 2009a; 2010a) de todo el mundo (Higes y col., 2013a).

4.1.3.3.a. Nosemosis tipo A

Normalmente, las colonias infectadas por *N. apis* no muestran signos claros de enfermedad, ni siquiera cuando la carga parasitaria es suficiente para causar pérdidas significativas en la producción de miel y en la eficiencia de la polinización (Anderson y Giacón, 1992; Fries y col., 1996). Durante el invierno, las colonias infectadas por *N. apis* pueden aumentar su mortalidad o incluso presentar una desaparición total de las abejas.

En algunos casos agudos de la infección, especialmente al inicio de la primavera, pueden aparecer manchas fecales marrones de olor desagradable sobre los cuadros y en el frontal de la colmena (Bailey, 1967 citado por OIE, 2013a). Este signo se ha relacionado prosaicamente con casos de diarrea en estos insectos, cuando lo que refleja es un acúmulo de heces en la ampolla rectal e imposibilidad de expulsarlas al exterior. En la entrada de la colmena o sus proximidades, se pueden observar un elevado número de abejas débiles o muertas con el abdomen aumentado de tamaño o encogido (Gómez, 1998), aunque en este caso tampoco deberían descartarse otras posibles causas.

El efecto de la nosemosis tipo A influye tanto a nivel de la abeja como a nivel de la colonia:

Sobre las abejas la nosemosis provoca una atrofia prematura de las glándulas hipofaríngeas, además altera el metabolismo de manera que se produce una reducción de la digestión de las proteínas (Tomaszweska, 1979), la cual hace que disminuyan las energías para poder volar, provocando finalmente el acortamiento de la vida de la abeja. Estos daños se traducen en cambios del ventrículo, que aparece de color marrón en las abejas sanas, mientras que en las abejas infectadas adquiere un color blanquecino y es mucho más frágil. La presencia de un abdomen hinchado en las abejas infectadas es debido a la acumulación de excrementos (Baley, 1981; Liu, 1984).

La malnutrición (Tomaszweska, 1979), unidas a la anemia producida por hemocitopenia (Gilliam y Shimanuki, 1967), producen una gran debilidad de la abeja como resultado de la falta de fuerzas para mover las alas y así poder volar, por ello pueden encontrarse numerosas abejas arrastrándose temblorosas cerca de la colmena (Moeller, 1978).

La nosemosis tipo A en la abeja reina induce la atrofia de las ovariolas hasta producir esterilidad.

Al nivel de la colonia los efectos son: principalmente la pérdida de abejas adultas tras el invierno o al inicio de la primavera porque no fueron capaces de acumular suficientes reservas en el cuerpo graso (Lotmar, 1939), lo que disminuyó la producción de miel, mientras que aumenta el consumo de miel durante el invierno, y un desarrollo inadecuado de las larvas y reinas debido a la escasa producción de jalea real (Wang y Moeller, 1969 citado por Alaux y col., 2010; Liu, 1990). Como consecuencia de todo el proceso la colonia se debilita, disminuyendo la puesta de la reina, por lo que ésta es reemplazada de forma natural por la colonia.

4.1.3.3.b. Nosemosis tipo C

A diferencia de *N. apis*, en *N. ceranae* se ha demostrado la ausencia de una prevalencia estacional y de signos clínicos en forma de depósitos fecales o el abdomen dilatado (Martín-Hernández y col., 2007; Higes y col., 2008c; Tapaszki y col., 2009). Los síntomas descritos para la nosemosis tipo C son distintos a la nosemosis tipo A, incluyendo una reducción gradual en la cantidad de abejas, un aumento de la mortalidad de la colonia entre otoño e invierno, y la presencia de pocas abejas jóvenes rodeando a la reina (Higes y col., 2006; 2008c; 2009a; 2013b). El daño que provoca *N. ceranae* a nivel de abeja aún no se conoce con precisión, haciéndose necesarios más estudios para completar su impacto en la salud de las abejas. Aunque se ha propuesto una estrecha relación entre la presencia de este patógeno y la muerte de colmenas (Higes y col., 2010a).

Se han realizado numerosas infecciones experimentales (Higes y col., 2007a), las cuales han demostrado que este patógeno produce una infección más perjudicial y con mayores porcentajes de mortalidad que la enfermedad provocada por *N. apis* (Paxton y col., 2007) tanto a nivel de individuo (Higes y col., 2007a, 2013a; Aliferis y col., 2012; Dussaubat y col., 2012, 2013a; McDonnell y col., 2013; Aufauvre y col., 2014; Mayack y col., 2015; Eiri y col., 2015) como a nivel de colonia (Higes y col., 2008c; Botías y col., 2012b, 2013; Dussaubat y col., 2013b; Goblirsch y col., 2013; Villa y col., 2013; Bekele y col., 2015; Wolf y col., 2014), aunque los daños sobre los tejidos son muy similares para ambas especies. Sin embargo, no todos los estudios han encontrado evidencias de los efectos perjudiciales de este microsporidio en las colonias de abejas (Fries, 2010; Stevanovic y col., 2013). La intervención de otros factores como las diferencias genéticas existentes entre las abejas melíferas (Bourgeois y col., 2012; Fontbonne y col., 2013; Huang y col., 2014), las distintas prácticas apícolas, las diferencias climáticas y ambientales, o el empleo de metodologías inapropiadas (Higes y col., 2013a) podrían ser la base de estos resultados aparentemente contradictorios.

La nosemosis tipo C presenta una prolongada fase sin síntomas visibles a nivel de colonia previos al despoblamiento de la misma (Higes y col., 2008c), aunque se

pueden descubrir una serie de signos muy sutiles que pueden pasar fácilmente desapercibidos, como por ejemplo: puesta de la reina en los meses más fríos, mayor cantidad de cría que abejas obreras en los meses templados o un descenso en la producción de miel en los dos años previos al colapso o muerte de la colonia. Un aumento de la cantidad de abejas jóvenes al inicio de la primavera puede diluir la enfermedad en las obreras y retrasarla en la reina, puesto que las abejas recién nacidas aún no han sido parasitadas (Higes y col., 2009b) y las abejas más infectadas son las pecoreadoras las cuales no vuelven a la colmena (Higes y col., 2008c, 2009a; Krajl y Fuchs, 2010; Wolf y col., 2014) o si lo hacen tardan más en volver y lo hacen con menor cantidad de alimento (Alaux y col., 2014; Naug, 2014).

Nosema ceranae es capaz de bloquear parcialmente los mecanismos de defensa humoral y celular de las abejas favoreciendo su desarrollo aumentando la disponibilidad de nutrientes y reduciendo la defensa de la abeja mediante la modificación de su “hábitat metabólico” (Vidau y col., 2014), mientras que *N. apis* no presenta dicha capacidad (Antúnez y col., 2009). Podría parecer que por su mayor virulencia *N. ceranae* podría desplazar a *N. apis*, pero las investigaciones realizadas demuestran que no es así por el momento (Martín-Hernández y col., 2012; Milbrath y col., 2015).

Se han desarrollado varios modelos matemáticos (Khoury y col., 2011; 2013; Betti y col., 2014; Perry y col., 2015) que demuestran que un agente patógeno que produce un estrés mantenido en el tiempo sobre una colonia de abejas, como es la reducción de la esperanza de vida de las abejas más viejas, puede llegar a producir el colapso de la misma. Betti y col. (2014) realizaron un modelo matemático donde utiliza a *N. ceranae* para demostrar que un agente nosógeno que mata abejas pecoreadoras de manera crónica puede llegar a colapsar una colonia de abejas, siendo este colapso más o menos rápido dependiendo del momento donde se produce la parasitación. Existe otro trabajo en el que se demostró una reducción del tiempo de vuelo unido a una disminución del éxito al regresar a la colmena en aquellas abejas infectadas con *N. ceranae* (Wolf y col., 2014), así como un comienzo precoz en las tareas de pecoreo por parte de las abejas nodrizas que se traduce en una reducción de la esperanza de vida de las abejas parasitadas (Goblirsch y col., 2013) y un menor cuidado de la cría lo que puede favorecer la aparición de otras enfermedades como la loque o la ascosferosis, por lo que *N. ceranae* puede estar involucrado en la pérdida de colonias de abejas registrada en todo el mundo. Particularmente, en España se ha demostrado que la ausencia de control del microsporidio *N. ceranae* es una de las principales causas de mortalidad de las explotaciones apícolas (Cepero y col., 2014a) puesto que este patógeno afecta a la abeja de forma individual y debilita a la colonia.

4.1.3.4. Diagnóstico de la nosemosis

Puesto que la nosemosis produce síntomas poco evidentes para la identificación y diagnóstico de las dos especies de microsporidios, la OIE (2013a) sugiere varios métodos:

1. Examen macroscópico

Tras la disección de la abeja se procede a examinar el aspecto y coloración del tubo digestivo. Concretamente el ventrículo de una abeja infectada pierde el tono muscular, adquiriendo un aspecto deformado, frágil, hinchado y flácido con un color blanco lechoso (Neira, 1994); mientras el ventrículo sano presenta un color verdoso amarillento y un aspecto más turgente. Sin embargo, el color lechoso del ventrículo también puede ser debido a otros problemas intestinales, tales como la alimentación con jarabes que contengan levaduras en crecimiento.

La extracción del ventrículo se realiza con una pinza, tirando del par posterior de segmentos abdominales, que saldrá acompañado de los tubos de Malpighi, el intestino delgado y el recto.

2. Examen microscópico

Para realizar un diagnóstico fiable, se aconseja utilizar varias abejas en cada muestra, tanto si partimos de métodos cualitativos como cuantitativos.

El método cualitativo que permite detectar la infección producida por *Nosema* spp. consiste en recoger un mínimo de 60 abejas de la entrada de la colmena encargadas de la pecorea con el fin de detectar el 5% de las abejas enfermas con un 95% de confianza (Fries, 1993). Al elegir este tipo de abejas se evita obtener falsos negativos procedentes de las abejas de interior que suelen estar menos parasitadas. A continuación, se separa el abdomen de cada una de las abejas y se homogenizan con agua destilada, se centrifugan y se colocan tres gotas del sedimento resuspendido en agua destilada sobre un portaobjetos con un cubreobjetos para observar la preparación a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases. Los exámenes microscópicos del macerado del contenido abdominal de las abejas analizadas permitirá la observación de las esporas ovales de *Nosema* spp. con un contorno oscuro. Aunque las esporas de *N. ceranae* son ligeramente más pequeñas, no es fácil diferenciar ambas especies de microsporidios al microscopio porque suelen aparecer como infecciones mixtas. En cambio, este método es válido para diferenciar *Nosema* spp. de otros microorganismos presentes en las abejas, como por ejemplo las levaduras.

Para un mayor detalle se puede emplear la tinción de Giemsa para teñir los contenidos internos. Con este tipo de tinción las esporas de *Nosema* spp. presentan

una pared gruesa sin teñir y un interior azul sin rasgos distintivos, ya que no llegan a visualizarse los núcleos del interior de las esporas.

Es muy importante no confundir las esporas de estos microsporidios con los quistes de *Malpighamoeba mellificae*, los cuales tienen un tamaño similar. La confusión es más importante en las infecciones con *N. apis*, ya que las infecciones por *M. mellificae* pueden cursar con diarrea que suele ser de un color amarillo sulfuroso y un olor peculiar.

El método cuantitativo para determinar el grado de infección consiste en el recuento de las esporas con una cámara de recuento o hemocitómetro (Cantwell, 1970 citado por OIE, 2013a) que posee una rejilla cuadrículada para el microscopio, calculando el número medio de esporas por área a partir del cual se puede estimar el número de esporas por abeja (Fries y col., 1984). Este método ha sido el elegido por muchos investigadores; sin embargo, otros estudios sugieren que es más correcto utilizar la proporción de abejas infectadas en la colonia para conocer el grado de infección (Doull, 1965; Higes y col., 2008c; Botías y col., 2012a).

Si no se observan esporas, el resultado debe considerarse como “no detectado”, pero esto no significa que las abejas no estén infectadas.

3. Técnicas de biología molecular

Como es complicado realizar la identificación específica mediante microscopía óptica, se han desarrollado diferentes métodos de diagnóstico molecular para este fin. El más empleado es la reacción en cadena de la polimerasa. La OIE (2008c) recomienda el empleo de una técnica de PCR multiplex desarrollada por Martín-Hernández y col. (2007) sobre la región SSU del gen 16S del ARN ribosomal, que sirve para diferenciar ambas especies en una única reacción, la cual fue posteriormente mejorada con la incorporación de un control interno procedente del gen COI de la abeja (Martín-Hernández y col., 2012) para conocer el estado de conservación del ADN en la muestra. Existe otra técnica desarrollada por Fries y col. (2013), en la misma región del ARN, por medio de la cual se pueden identificar los dos agentes patógenos, así como *Nosema bombi*, al mismo tiempo. A su vez también se han aplicado técnicas de PCR cuantitativa para distinguir ambas especies de microsporidios (Rivière y col., 2013).

Recientemente se ha desarrollado un medio de cultivo celular para *N. ceranae* que va acoplado con un protocolo de RT-PCR-ELISA para su diagnóstico (Gisder y Genersch, 2015).

También existe una técnica de amplificación isotérmica del ADN mediada por cebadores en bucle (LAMP) para diferenciar *N. apis* y *N. ceranae* (Ptaszynska y col., 2014).

4.1.3.5. Tratamiento y control de la nosemosis

La nosemosis se presenta en todo el mundo, pero el tratamiento de las abejas puede ayudar a prevenir la propagación de la infección a las colonias de abejas no infectadas.

Las esporas de *N. apis* se pueden destruir con ácido acético al 60% (Bailey, 1957 citado por OIE, 2013a) o calentando el material apícola a una temperatura de al menos 60°C durante 15 minutos, mientras que los panales pueden esterilizarse aplicando una temperatura de 49°C durante 24 horas (Cantwell y Shimanuki, 1970 citado por OIE, 2013a). Este método no sirve para las esporas de *N. ceranae*, que pueden soportar 60°C de temperatura (Fenoy y col., 2009). Para que estos tratamientos sean eficaces, pueden combinarse con el aporte de alimento a las colonias medicado con fumagilina, con el fin de eliminar las infecciones en las abejas. También se puede reducir la infección aportando a las abejas jarabes con timol y resveratrol, el cual incluso ha demostrado aumentar la esperanza de vida de las abejas (Maistrello y col., 2008).

En general, el producto activo más utilizado para el control de la nosemosis ha sido la fumagilina (Katznelson y Jamieson, 1952; Cantwell y Shimanuki, 1970 citado por OIE, 2013a; Fries, 1997 citado por Garrido-Bailón, 2012; Nozal y col., 2008) en forma de jarabe de azúcar. Este antibiótico se extrae a partir del hongo *Aspergillus fumigatus* (Bailey, 1955; Webster, 1994; Didier, 1997). Aunque el uso de antibióticos en abejas melíferas está prohibido en muchos países y en la Unión Europea, este producto es una de las pocas moléculas activas frente a los microsporidios (McCowen y col., 1951; Gisder y Genersch, 2015), actuando solamente sobre la forma vegetativa de *Nosema* spp., en el interior de las células del epitelio ventricular, y, por lo tanto, favoreciendo la reepitelización de las zonas afectadas. Este antibiótico puede alcanzar un 100% de eficiencia durante seis meses si es aplicado en una posología adecuada (Higes y col., 2008c, 2009a) durante el otoño (Bailey, 1955). No obstante, es importante destacar la alta inestabilidad de la fumagilina frente a la radiación, lo que implica una rápida degradación de la misma; en cambio, la temperatura tiene un efecto menor (Nozal y col., 2008). Algunos experimentos han demostrado que la producción de miel en colonias infectadas y asintomáticas es mucho menor en las colonias sin tratar que en aquellas que han sido tratadas con fumagilina (Botías y col., 2013).

En cualquier caso, antes de recurrir a un tratamiento veterinario, es fundamental prevenir la aparición de nosemosis. Para ello, las medidas recomendadas para evitar la transmisión de la enfermedad son: desinfección sistemática del material apícola con ácido acético y derivados (Bailey, 1957 citado por OIE, 2013a), limpieza de la colmena al terminar la invernada, mantenimiento adecuado de los bebederos, sustitución de los panales viejos, manejo adecuado del material utilizado en las tareas

del colmenar, evitar la captura de enjambres con procedencia desconocida, realizar el cambio de reina anualmente (Botías y col., 2012b; Muñoz y col., 2014), y realizar exámenes de laboratorio periódicamente. Principalmente, el apicultor debe evitar una manipulación excesiva de las colmenas al comienzo de la primavera mientras las condiciones meteorológicas no sean adecuadas.

Niveles adecuados de proteínas (polen) en la dieta de las abejas pueden favorecer su salud y reducir la susceptibilidad a padecer nosemosis (Basualdo y col., 2014; Antúñez y col., 2015).

4.1.4. Infección por neogregarinos

Los neogregarinos son un grupo de protistas incluidos en el Filo Apicomplexa. Como representante de este orden se encuentra *Apicystis bombi*, que pertenece a la familia Lipotrophidae y es el grupo hermano más cercano de *Mattesia*. De hecho, en un principio, el parásito fue descrito erróneamente como *Mattesia*. El género *Apicystis* se creó para incluir a aquellos organismos en los cuales el ooquiste contiene cuatro esporozoitos, mientras que los otros géneros presentan ocho (Lipa y Triggiani, 1996). Sin embargo, muy pocos datos justifican la creación de este nuevo género puesto que la clasificación del Filo Apicomplexa no es muy sólida (Leander, 2008) y el Orden Neogregarinorida está débilmente consolidado (Rueckert y Leander, 2008). En la actualidad, no hay suficientes secuencias disponibles de neogregarinos para establecer conclusiones fiables, aunque no parecen formar un grupo monofilético. Los neogregarinos son parásitos de insectos y presentan reducidas etapas de trofozoito (Leander, 2008; Rueckert y Leander, 2008).

El neogregarino *A. bombi* fue descubierto en Italia en 1988 y es capaz de parasitar tanto a *A. mellifera* (Lipa y Triggiani, 1996) como *Bombus terrestris* (Plischuk y Lange, 2009), así como a otras especies de *Bombus* (Liu y col., 1974 citado por Maharramov y col., 2013; Macfarlane y col., 1995; Lipa y Triggiani, 1996; Baer y Schmid-Hempel, 2001; Rutrecht y Brown, 2008).

Este protista ocasiona graves efectos físicos en los abejorros, como la disrupción del tejido adiposo, y de comportamiento como la reducción del éxito en el establecimiento de colonias, el aumento de las tasas de mortalidad de las obreras y los conflictos de comunicación entre la reina y las obreras (Schmid-Hempel, 2001; Rutrecht y Brown, 2008). Macfarlane (1995) sugirió que este neogregarino podía provocar la muerte prematura de las reinas de abejorro y aunque los datos empíricos sobre la patología del parásito son limitados, se sabe que el cuerpo graso de los abejorros infectados es destruido por la proliferación del patógeno (Liu y col., 1974 citado por Maharramov y col., 2013; Schmid-Hempel, 2001), dada la importancia de este tejido para la puesta en marcha de la colonia (Goulson, 2010) su presencia se correlaciona con una alta mortalidad en las reinas infectadas en primavera, lo que les

impide establecer colonias (Rutrecht y Brown, 2008). En consecuencia, al entrar en contacto con poblaciones nuevas, *A. bombi* puede tener el potencial para actuar como una enfermedad infecciosa emergente.

Esta mortalidad en reinas hibernantes parece deberse a la degradación del tejido adiposo ocurrida en los abejorros muy infectados. Aunque *Apicystis bombi* puede diseminarse por medio de las reinas infectados que sobrevivan a la enfermedad, es posible su transmisión a través de vectores. Sin embargo, hasta la fecha aún no se ha confirmado si el neogregarino, encontrado en las poblaciones de abejorros y abejas europeas de Argentina, fue adquirido *in situ* o si fue co-introducido desde Europa con ellos.

Aunque se dispone de pocos datos epizootiológicos, *A. bombi* normalmente tiene una baja prevalencia (Lipa y Triggiani, 1996). El estudio de obreras al final de la temporada mostró una prevalencia similar de *A. bombi* en comparación con las reinas de primavera (Rutrecht y Brown, 2008).

La PCR múltiple descrita por Meeus y col. (2010), para el estudio de los neogregarinos y tripanosomátidos, permite detectar *A. bombi* y todas las especies de neogregarinos e incluso se ha demostrado que detecta *Crithidia bombi* en muestras de heces.

4.1.5. Infección por tripanosomátidos

La mayoría de tripanosomátidos de los insectos han sido descritos para los hemípteros y dípteros (Langridge y McGhee, 1967). Existen pocos estudios sobre protistas flagelados en *Apis mellifera* (Wallace, 1966), cuyos principales representantes pertenecen a los géneros *Crithidia* (Lom, 1964 citado por Langridge y McGhee, 1967) y *Leptomonas* (Lotmar, 1946 citado por Langridge y McGhee, 1967), entre los cuales destacan las especies *Crithidia mellificae* y *Leptomonas apis*.

Crithidia bombi es un parásito que se encuentra en el intestino de los abejorros (Sadd, 2011). Este organismo presenta varios morfotipos, determinados por la forma celular y la posición relativa del cinetoplasto y el núcleo, así como la posición de la bolsa flagelar (Hoare y Wallace, 1966; Maslov y col., 2001). Se han demostrado asociaciones específicas entre *Bombus terrestris* y *C. bombi* (Schmid-Hempel, 2001; Mallon y col., 2003).

Crithidia mellificae fue el primer tripanosomátido descrito en abejas de origen australiano (Langridge y McGhee, 1967). Morfológicamente se trata de un organismo ovoide, con un extremo anterior achatado que se va estrechando gradualmente hasta terminar en una punta delgada en la parte posterior, que alcanza un tamaño de 7 x 5,5 µm. Presenta dos formas de vida: una fase libre que se desplaza mediante flagelos y

una fase redondeada e inmóvil que se mantiene adherida a las paredes del recto en la región de la papila rectal. Su hospedador principal es *Apis mellifera* y se localiza en distintas zonas de su tracto digestivo dependiendo del grado de infección: en la papila rectal en infecciones leves, y a lo largo de todo el recto e íleon posterior en el caso de infecciones severas; libre o unido a las paredes del recto.

Según Langridge (1967), este organismo no presenta efectos patológicos en los himenópteros; por el contrario, *C. bombi* si provoca efectos graves en abejorros, particularmente bajo condiciones de inanición (Brown y col., 2000; 2003). A pesar de la afirmación de Langridge, otros estudios han demostrado que la presencia de *C. mellificae* en las colmenas puede producir un efecto potenciador de los daños producidos por *N. ceranae* y, por ello, se ha considerado como un nuevo factor que contribuye a explicar las pérdidas de colonias durante el invierno (Ravoet y col., 2013).

La transmisión del parásito entre abejas de la misma colmena o entre colonias ocurre mientras recogen alimento de las flores y a través de organismos eliminados en las heces (Durrer y Schmid Hempel, 1994).

Se ha demostrado que la infección de *Crithidia mellificae* alcanza su punto máximo en el mes de enero (Runckel y col., 2011), y que la presencia de *C. mellificae* está fuertemente asociada con infecciones de bacterias del género *Spiroplasma* y con el microsporidio *N. ceranae* (Runckel y col., 2011). Un estudio realizado en EE.UU. sobre colonias de abejas confirmó la asociación de *C. mellificae* y *N. ceranae*, los cuales, al aparecer en coinfección causaron un impacto sinérgico negativo en la longevidad de la colonia (Ravoet y col., 2013).

Varios estudios presuponen la posibilidad de que *C. mellificae* sea capaz de infectar a las colonias de *Apis mellifera* en todo el mundo. De hecho, en la actualidad se ha detectado en muestras de *Apis mellifera* de los Estados Unidos. (VanEngelsdorp y col., 2009; Cox-Foster y col., 2007; Runckel y col., 2011; Cornman y col., 2012), Bélgica (Ravoet y col., 2013), China (Yang y col., 2013), Japón (Morimoto y col., 2013), y Suiza (Schmid-Hempel y Tognazzo, 2010). Además, la infección de *C. mellificae* encontrada en *Apis cerana* en China (Yang y col., 2013), no fue confirmada en un estudio posterior en colonias de *Apis ceranae japonica* en Japón (Morimoto y col., 2013).

La infección que produce *Crithidia* provoca una serie de alteraciones sobre el estado fisiológico de los abejorros que incluyen: una disminución de la capacidad de pecoreo (Gegear y col., 2005), la reducción de la supervivencia individual en condiciones adversas (Brown y col., 2000), la reducción en el éxito de fundar una colonia y la degeneración del estado físico general de las reinas (Brown y col., 2003). En la actualidad *Crithidia mellificae* ha despertado el interés de muchos investigadores por su posible implicación con la pérdida de colonias recientemente documentado en

colmenares de EE.UU. y Bélgica (Cornman y col., 2012; Ravoet y col., 2013; Runckel y col., 2014).

A la hora de hacer un diagnóstico puede ser necesario cultivar este organismo. *Crithidia mellificae* requiere un medio difásico en las primeras etapas de cultivo, el cual contiene, por un lado, agar con sangre de pollo estéril y heparinizada y, por otro lado, se le añade un medio modificado de Cowperthwaite con un pH óptimo de crecimiento entre 4,5 – 5,5, ya que se trata de un organismo acidófilo. Posteriormente puede ser propagado indefinidamente en un medio monofásico de pH 5,2. Después de su cultivo, *C. mellificae* se puede observar al microscopio a 100 o 400 aumentos tras haber realizado una tinción con Giemsa.

Las técnicas microscópicas se utilizan habitualmente para el diagnóstico de *Crithidia*, pero el grado de sensibilidad de esta técnica presenta un debate abierto entre los distintos investigadores (Weiss, 1995). Hoy en día las técnicas moleculares basadas en PCR para la amplificación del rDNA han mejorado la sensibilidad de la detección de patógenos como este tripanosomátido (Weiss y Vossbrinck, 1998; Klee y col., 2006). Para la detección de estos organismos se ha desarrollado una PCR que permite la detección simultánea del neogregarino *A. bombi* mediante el empleo de dos parejas de cebadores de amplio rango (Meeus y col., 2010). Este tipo de cebadores de amplio rango, respecto a los cebadores específicos, tienen la ventaja de poder detectar los parásitos emergentes relacionados con este género.

Debido a que no existen unos límites morfológicos bien determinados, varios estudios apoyan la necesidad de revisar la clasificación actual a nivel de género, especialmente para *Crithidia* (Meeus y col., 2010; Cepero y col., 2014a) y *Leptomonas*.

4.1.6. Ascosferosis (agente *Ascosphaera apis*)

4.1.6.1. Etiología de la ascosferosis

La ascosferosis, cría yesificada o pollo escayolado es una enfermedad causada por el hongo *Ascosphaera apis*, que, como su nombre indica afecta a la cría de las abejas (Spiltoir, 1955 citado por Bailey y Ball., 1991; Spiltoir y Olive, 1955 citado por Campano y col., 1999). Este hongo fue reconocido en la abeja melífera por primera vez a principios del siglo XX por Maassen, quién lo denominó *Pericystis apis* (Maassen, 1913), aunque hoy en día pertenece a la división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Onygenales y Familia Ascosphaeraceae.

El género *Ascosphaera* comprende una serie de especies que están adaptados a las abejas eusociales (Aronstein y Murray, 2010; Jensen y col., 2013) y solitarias (Wynns y col., 2013; McFrederick y col., 2014). Algunas de estas especies son saprofitas, y crecen sobre los alimentos almacenados, el material fecal y los desechos

de la colmena; otras han evolucionado convirtiéndose en patógenos oportunistas y/o obligados de las abejas (Bissett, 1988; Klinger y col., 2013), como es el caso de *A. apis*. En algunos casos, a partir de colonias infectadas con ascosferosis, se han aislado las especies *Ascosphaera mayor* y *Arrhenosphaera cranae* (ambos pertenecientes a la familia Ascospheraceae), que podrían ser consideradas como invasores secundarios, aunque los postulados de Koch nunca se han demostrado para ellos.

Ascosphaera apis es un hongo heterotálico compuesto por hifas septadas hialinas, con un diámetro de 2,5-8 μm . En medios de cultivo sólido, *A. apis* forma un micelio denso y blanco que contiene hifas aéreas y superficiales con una ramificación dicotómica muy pronunciada (Spiltoir, 1955 citado por Bailey y Ball, 1991; Skou, 1988 citado por Jensen y col., 2013). En este tipo de hongos, la reproducción sexual se produce entre cepas haploides (+ y -) morfológicamente idénticas, distinguiéndose únicamente por su tipo de apareamiento (Bissett, 1988; Anderson y Gibson, 1998; Poggeler, 2001). Como resultado de la reproducción sexual se originan frutos denominados cuerpos fructíferos (con un diámetro aproximado de 80 μm , dependiendo de la temperatura y el medio de cultivo utilizado), que son globosos y de color gris verdoso o marrón, los cuales contienen muchos ascocistos (11-17 μm) envueltos por una membrana externa transparente y, a su vez, en su interior se encuentran las ascosporas hialinas (1-2 x 2,5 μm) con forma elipsoidal, que tienen una pared gruesa, una membrana con muchas depresiones y un esporoplasma con numerosos ribosomas y mitocondrias (Bissett, 1988). Esta morfología confiere a las ascosporas una gran resistencia frente a temperaturas extremas, a radiaciones UV, a la temperatura de fusión de la cera y a la acción de soluciones formuladas, pudiendo sobrevivir durante años en el medio ambiente (Aronstein y Murray, 2010).

Las ascosporas son el resultado de la reproducción sexual de los micelios de hongos con el sexo opuesto, a diferencia de la mayoría de otros hongos patógenos de insectos que forman conidios asexualmente, que son las unidades infecciosas, como por ejemplo, en *Aspergillus*. Dado que *A. apis* realiza una reproducción sexual se han observado cepas con haplotipos diferentes (Vojvodic y col., 2011a; Lee y col., 2013).

Las ascosporas que forma este hongo durante la reproducción sexual constituyen la fase infectante de la enfermedad (Spiltoir, 1955 citado por Bailey y Ball, 1991; Hitchcock y Christensen, 1972). La infección afecta a las larvas con 3 a 4 días de edad, las cuales adquieren las ascosporas a través de los alimentos (Matus y Sarbak, 1974 citado por Aronstein y Murray, 2010) y no a través de la superficie corporal, como se pensó en un principio (Roussy, 1962 citado por Aronstein y Murray, 2010); a diferencia de otros hongos patógenos de insectos que infectan principalmente a través de la cutícula externa. Glinski y Jarosz (2001 citado por Aronstein y Murray, 2010) demostraron que los componentes químicos de la cutícula, como las ceras y los ácidos grasos insaturados, tienen una potente actividad antifúngica.

Las larvas infectadas rápidamente reducen la consumición de alimento para, finalmente, dejar totalmente de comer. Las ascosporas ingeridas por la larva con el alimento (Heath, 1982 citado por Bailey y Ball, 1991; Puerta y col., 1994) llegan a la mucosa intestinal y allí es donde comienzan a germinar, probablemente estimuladas por la acumulación de CO₂ (Bailey y Ball, 1991) producido por los tejidos y situado junto al intestino posterior de las larvas (Heath y Gaze, 1987). Las ascosporas de *A. apis* pueden permanecer latentes y viables durante años, ya que están bien adaptadas al entorno áspero y duro del intestino larvario, pero tras la exposición al CO₂ las ascosporas se activan, aumentando su tamaño y posteriormente dan lugar a la formación del tubo germinal, que se extiende para formar hifas (Bamford y Heath, 1989). En una larva infectada, las hifas penetran la membrana peritrófica del intestino medio de las larvas (Theantana y Chantawannakul, 2008) ayudadas por la secreción de enzimas producidas por *A. apis*, para favorecer el desarrollo del micelio dentro de la cavidad corporal. Después de unos pocos días, el micelio invade los tejidos y termina rompiendo la cutícula en el extremo posterior de la larva (Koenig y col., 1987), dejando la cabeza intacta (Aronstein y Murray, 2010). Los cuerpos fructíferos con las nuevas ascosporas se forman en las hifas aéreas fuera de las larvas muertas. La muerte ocurre como resultado final de un daño mecánico y enzimático, de la interrupción de la circulación de la hemolinfa y de una toxicosis generalizada (Glinski y Buczek, 2003 citado por Aronstein y Murray, 2010). El crecimiento vegetativo de *A. apis* se va extendiendo desde el extremo posterior de la larva al anterior, hasta que está recubierta por una gruesa capa de micelio blanco. A continuación, el crecimiento fúngico es moteado con manchas color marrón o negro, debido a la producción de los cuerpos fructíferos que puede variar en tamaño y color.

Los cadáveres de las larvas se encuentran normalmente estirados en las celdas en una posición vertical, aumentadas de tamaño hasta cubrir el hueco de la celda. Posteriormente se deshidratan y forman las denominadas momias que pueden ser blancas o negras. Las primeras están compuestas fundamentalmente por restos celulares o fragmentos del micelio (Gochnauer y Hughes, 1976) y las segundas están compuestas por ascosporas, de hecho cada momia negra contiene entre 10⁸-10⁹ ascosporas (Hornitzky, 2001 citado por Aronstein y Murray, 2001). Tras varios estudios, lo que parece más probable es que las momias más jóvenes son blancas y, con suficiente tiempo y las condiciones apropiadas, llegan a ser negras debido al desarrollo final de las ascosporas.

La fagocitosis y la encapsulación son los mecanismos de defensa más comunes en abejas contra hongos entomopatógenos (Glinski y Buczek, 2003 citado por Aronstein y Murray, 2010).

Cuando las barreras exteriores son atravesadas, los hongos invasivos se encuentran con una variedad de defensas inmuno fisiológicas por activación de las

reacciones inmunes humores y celulares (Glinski y Jarosz, 2001 citado por Aronstein y Murray, 2010). La activación de la inmunidad humoral induce la síntesis de péptidos antimicrobiales y enzimas bacteriolíticas.

4.1.6.2. Epidemiología de la ascosferosis

La ascosferosis consiste en una micosis invasiva que afecta exclusivamente a las larvas de abejas en desarrollo. Aunque las ascosporas pueden infectar a todas las castas de la cría de abejas melíferas, es menos frecuente en reinas. La susceptibilidad a la infección depende de la edad larvaria y su momento óptimo es en los cuatro primeros días de edad (Bailey 1963; 1981; De Jong, 1976).

Si bien las abejas adultas no son susceptibles a este patógeno, juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad, tanto dentro de la colmena como entre ellas a través del pillaje o la deriva. Además, las pecoreadoras pueden llevar las ascosporas, pasarlas a las nodrizas a través de la trofalaxia y éstas a su vez a las larvas cuando las alimentan. Pero sin duda, la transmisión entre colonias es principalmente provocada por los apicultores al intercambiar material contaminado con esporas fúngicas (Gilliam y Vandenberg, 1997 citado por Aronstein y Murray, 2010). Este material contaminado es una fuente de infección de larga duración (Toumanoff, 1951; Gilliam, 1986; Flores y col., 2005).

Las ascosporas del hongo *A. apis* pueden contaminar todas las superficies de la colmena de abejas y se acumulan en todos los productos de la colmena (la cera fundida, el polen almacenado y la miel), pudiendo permanecer viables e infecciosos durante más de 15 años (Toumanoff, 1951), debido a que son muy resistentes al medio ambiente. Sin embargo, la viabilidad de las esporas se reducirá con el tiempo y esto variará según las cepas. Además, las diferentes cepas de *A. apis* han demostrado distintos grados de virulencia hacia las abejas (Glinski, 1982 citado por Aronstein y Murray, 2010; Vojvodic y col., 2011a) y también pueden variar en otros rasgos biológicos.

La ascosferosis puede reducir la productividad de la colonia mediante una severa reducción del número de obreras emergentes (Jensen y col., 2013), y en algunos casos puede llevar a la pérdida de colonias. Esta enfermedad presenta una amplia distribución y se encuentra infectando a la cría de la abeja melífera en la mayoría de las regiones del mundo (Aronstein y Murray, 2010), incluyendo los climas cálidos y secos, aunque no es una enfermedad de declaración obligatoria ni de comunicación semestral a la UE, por lo que su notificación no está regulada dentro del RD 526/2014.

En Asia, la ascosferosis no se considera como una enfermedad grave de las abejas, mientras que en Japón la enfermedad provoca serios problemas a los

apicultores. En zonas templadas de América y Europa, también se han reportado casos en los que la ascosferosis ha causado graves daños a la apicultura (Aronstein y Murray, 2010; OIE, 2010).

Además, se ha demostrado que el enfriamiento de la cría por debajo de la temperatura óptima incrementa el número de larvas enfermas (Vojvodic y col., 2011b; Flores y col., 1996).

La temperatura de las larvas influye en el crecimiento de *A. apis*, siendo mayor en larvas mantenidas a baja temperatura ya que en condiciones naturales la temperatura de crecimiento y formación de cuerpos fructíferos es sobre 30°C (Aronstein y Murray, 2010). Varios experimentos han demostrado que la cría es más susceptible cuando se enfría inmediatamente después de que la celdilla ha sido sellada (Bailey, 1967a). Basta sólo una ligera reducción de temperatura por debajo de la normal (35°C) durante unas pocas horas. Esto puede suceder a principios de verano, en las larvas de zánganos que se localizan en la periferia del nido de cría, en colonias pequeñas cuyo riesgo de enfriarse es mayor al tener una menor capacidad para calentar y superficies relativamente amplias e incluso en climas templados.

La ascosferosis es más prevalente durante primaveras con cambios bruscos de temperatura, dado que el crecimiento del hongo se ve favorecido por las colmenas frías y húmedas, es decir, mal ventiladas (Puerta y col., 1994; Flores y col., 1996; Borum y Ulgen, 2008). La enfermedad se agrava cuando disminuye la proporción de abejas adultas respecto a la cría (Koenig y col., 1987).

Otros factores no letales, como infecciones leves por virus o bacterias, parasitaciones por *V. destructor*, envenenamientos, estrés o incluso una alimentación inadecuada de las nodrizas enfermas, podrían causar los mismos efectos que el enfriamiento al disminuir la tasa de desarrollo de las larvas (Bailey y Ball, 1991), y afectar, en último término, a la incidencia y severidad de la enfermedad.

El hongo causante de la ascosferosis o cría yesificada de las abejas tiene un estrecho rango de hospedadores y una única vía de infección que se basa exclusivamente en la reproducción sexual, con muchas adaptaciones específicas del hospedador. Por lo tanto, muchos métodos conocidos a partir de hongos patógenos de insectos no se adaptan adecuadamente para el estudio de la ascosferosis. De hecho, algunos autores sugieren que la poliandria se originó en los insectos sociales para aumentar su resistencia a ciertos patógenos que presentaban diversos genotipos, como por ejemplo *A. apis* (Lee y col., 2013).

4.1.6.3. Patología de la ascosferosis

Los síntomas clínicos de la ascosferosis a menudo aparecen sólo durante un corto período de tiempo, habitualmente asociados a climas fríos y húmedos (Aronstein y Murray, 2010).

El síntoma más frecuente en una colonia afectada es la presencia de celdas sin opercular dispersas de forma irregular en los cuadros de cría. Aquellas celdas selladas con cría infectada pueden presentar opérculos ligeramente aplanados o perforados. Inicialmente, las larvas muertas en celdas sin opercular, principalmente de obreras y zánganos, se hinchan hasta llenar toda la celda y son cubiertas por el micelio blanquecino del hongo. Posteriormente, las larvas muertas se deshidratan y se endurecen, transformándose en momias blancas similares a pequeños trozos de tiza, dando origen al nombre de la enfermedad (cría yesificada). El color de las larvas muertas varía con la etapa de crecimiento de los micelios: inicialmente blanco, a continuación varía hacia el gris y finalmente, negro cuando se forman los cuerpos fructíferos.

La observación de cuadros puede revelar diferentes etapas de la enfermedad, desde la presencia de larvas muertas frescas cubiertas con el micelio blanco similares al algodón, hasta momias secas blancas o negras cuando la enfermedad está muy avanzada. Cuando la infección es fuerte, gran parte de la cría sellada muere y se seca dentro de las celdas y al agitar estos panales las larvas momificadas producen un sonido de traqueteo como un sonajero.

A menudo pueden encontrarse momias en los panales, en la entrada o en el fondo de la colmena o incluso dentro del caza polen (Jensen y col., 2013), este hecho solo indica la presencia de la enfermedad y no sirve como medida de su intensidad.

Gilliam y col. (1983) demostraron la importancia del comportamiento higiénico de las abejas como principal mecanismo de resistencia a la ascosferosis. Las abejas de colonias con este comportamiento son particularmente sensibles a los estímulos olfativos asociados con la cría enferma y, por ello, son capaces de desopercular celdas con cría infectada y eliminarlas. Aquellas abejas capaces de detectar olores anormales de la cría a niveles más bajos comenzaran rápidamente a desopercular las celdas infectadas y eliminaran la cría enferma antes de que sea infecciosa (Wilson-Rich y col., 2009), lo cual reducirá las consecuencias de la ascosferosis y es un rasgo a seleccionar en la reproducción de las colonias de abejas.

4.1.6.4. Diagnóstico de la ascosferosis

El diagnóstico de campo de la ascosferosis se basa en la detección visual de la enfermedad como la presencia de cría momificada en los panales de cría. Tras el diagnóstico de campo es necesario confirmar la presencia de *A. apis*, para lo cual se pueden emplear diversas técnicas que serán mencionadas a continuación.

1. Examen microscópico

En el laboratorio, el hongo puede ser identificado por la morfología de sus ascosporas realizando un frotis. Las ascosporas se pueden montar en un portaobjetos con una gota de agua destilada y se observan en el microscopio a 100-400 aumentos (Anderson y Gibson, 1998). La tinción de estas preparaciones con azul de lactofenol aumenta el contraste y mejora el análisis de la morfología del cultivo. La presencia de cuerpos fructíferos en las muestras es un diagnóstico de la enfermedad.

En el caso de que sólo hubiese momias blancas, el diagnóstico bajo el microscopio no es determinante dado que no habrá ascosporas, y es necesario hacer un cultivo microbiológico del hongo en un medio adecuado para detectar estructuras reproductivas.

2. Cultivo microbiológico

Para aislar *A. apis* se pueden utilizar momias frescas o secas, tanto blancas como negras, recogidas directamente de los cuadros de cría, de la entrada o del fondo de la colmena. Sin embargo, es preferible realizar el cultivo a partir de momias negras que son las que producen las ascosporas.

El hongo *A. apis* es capaz de crecer en diferentes medios de cultivo, tales como agar-dextrosa patata (PDA) (Skou, 1972 citado por Bailey y Ball, 1991), agar levadura-glucosa-almidón (YGPSA) y agar dextrosa Sabouraud (Bailey, 1981; Anderson y Gibson, 1998; Hornitzky, 2001 citado por Aronstein y Murray, 2001), pero crecen muy bien en medios con un alto contenido de azúcar, como MY-20 (Udagawa y Horie, 1974; Raper y Fennell, 1965).

Las placas de cultivo deben mantenerse a 30°C (Aronstein y Murray, 2010) bajo condiciones aeróbicas para el desarrollo del micelio (Bailey, 1967a) y la formación de cuerpos fructíferos, mientras que las ascosporas requieren un ambiente prácticamente anaerobio (CO₂ 10%) (Heath y Gaze, 1987) y 35°C, para poder germinar y producir un único tubo vegetativo.

Normalmente, el crecimiento del micelio en placa es visible en 2-3 días y la formación de cuerpos fructíferos se observará a los 4-6 días. Para evitar el crecimiento bacteriano en las placas de cultivo es aconsejable añadir compuestos antibacterianos,

como por ejemplo: cloranfenicol, cicloheximida o estreptomicina. Igualmente, es recomendable realizar un tratamiento de calor del inóculo, antes de la siembra, para matar los posibles microbios no formadores de esporas que se encuentran habitualmente en las momias (Johson y col., 2005).

3. Diagnóstico biológico

La identificación de las etapas vegetativas del hongo se puede hacer mediante una prueba de apareamiento con dos cepas de referencia (AFSEF 7405 y ARSEF 7406). La producción de quistes de esporas con una de las cepas de referencia probaría la identidad de apareamiento con *A. apis*.

4. Identificación bioquímica y molecular

Se han desarrollado varias parejas de cebadores específicos para la detección de *A. apis* en la región ITS (Segmento Transcrito Interno) de la unidad de repetición ribosomal nuclear, ya que es el lugar más utilizado para la identificación molecular de especies de hongos (Nilsson y col., 2008). La pareja de cebadores 3-F1 y 3-R1, que fueron diseñados por James y Skinner (2005), se emplean frecuentemente para la identificación de *A. apis*, y también se utilizan para realizar estudios de secuenciación, ya que ambos cebadores son específicos de *A. apis*, a diferencia del par de cebadores AscF3 y AapiR3 desarrollados por Murray y col. (2005). Años después se desarrolló una PCR múltiple capaz de amplificar simultáneamente el gen 5.8S RNAr de *A. apis* y el gen 16S RNAr de las bacterias *P. larvae* y *M. plutonius*, para amplificar en una única reacción los principales patógenos que afectan a la cría de abejas (Garrido-Bailón y col., 2013).

El método de PCR de la huella genética, mediante el empleo aleatorio de los cebadores BOX, REP y ERIC (Reynaldi y col., 2003 citado por Vojvodic y col., 2011a), se utiliza para identificar aislados de *A. apis*, aunque también se han desarrollado marcadores de microsatélites para este fin (Rehner y Evans, 2009). Recientemente se han identificado tres loci altamente variables en las regiones intergénicas o intrones que sirven para identificar y diferenciar las cepas de *A. apis* (Jensen y col., 2012).

En los últimos años se han diseñado cebadores para la identificación, tanto de las cepas como de sus tipos de apareamiento, y cuantificación de los transcritos de *A. apis* empleando técnicas de PCR a tiempo real (Lee y col., 2006 citado por Garrido-Bailón y col., 2013; Aronstein y col., 2007).

El genoma de *A. apis* se publicó en 2006 (Qin y col., 2006), y aunque no se ha completado su secuencia, será útil para investigaciones futuras sobre la expresión de genes importantes para la infección y la virulencia de *A. apis* (Cornman y col., 2012).

4.1.6.5. Tratamiento y control de la ascosferosis

Hay una serie de técnicas de manejo que pueden ser utilizadas para reducir la concentración de esporas en las colonias y, por lo tanto, para minimizar los efectos de la ascosferosis en las colonias infectadas, como por ejemplo:

1. Reducir el volumen de la cámara de cría para la invernación y añadir abejas adultas jóvenes y marcos de cría para fortalecer las colmenas debilitadas (Seal, 1957 citado por Jensen y col., 2013) adaptando el tamaño de la colmena a la fuerza de la colonia.
2. Ampliar la entrada de la colmena para favorecer la ventilación (Gochnauer y col., 1975 citado por Aronstein y Murray, 2010) y así evitar la acumulación de humedad.
3. Sustituir los panales viejos (Betts, 1951 citado por Jensen y col., 2013)
4. Realizar un tratamiento térmico adecuado de la cera (Flores y col., 2005)
5. Reemplazar la reina en las colonias afectadas (Lunder, 1972 citado por Jensen y col., 2013)
6. Evitar el estrés, y en particular el enfriamiento, de la cría (Flores y col., 1996).
7. No criar reinas de una colonia que haya tenido síntomas clínicos de ascosferosis.
8. El calentamiento artificial de las colmenas en primavera disminuye la incidencia de la enfermedad (Pederson, 1976 citado por Garrido-Bailón y col., 2013).
9. El calentamiento de la miel durante 8h a 65°C o 2h a 70°C en baños de agua para eliminar las esporas antes de utilizar esa miel para la alimentación de las abejas (Anderson y col., 1997 citado por Aronstein y Murray, 2010) o alimentarlas con jarabe de azúcar.

Aunque la fumigación con óxido de etileno (Gouchnauer y Margetts, 1980), la radiación gamma liberada por Cobalto 60 (Katznelson y Robb, 1962) y haces de electrones de alta velocidad (Shimanuki y col., 1984) son capaces de destruir las ascosporas hasta la fecha, no existe ningún tratamiento químico eficaz contra esta enfermedad (Hornitzky, 2001 citado por Aronstein y Murray, 2010). Sin embargo, se han realizado varios ensayos *in vitro* (Puerta y col., 1990 citado por Jensen y col., 2013; Flores y col., 1996) e *in vivo* (Flores y col., 2001) para evaluar diferentes tratamientos químicos que puedan ser utilizados para el control de la ascosferosis.

Una alternativa para el control de la ascosferosis es la utilización de productos naturales como los aceites esenciales de diversas plantas (Kloucek y col., 2012) y los

propóleos (Wilson y col., 2015), así como la lisozima-HCl que se trata de un compuesto antimicrobiano procedente de la clara del huevo de gallina (Van Haga y col., 2012).

La ascosferosis es una enfermedad relacionada con el estrés y un reciente estudio longitudinal de cohorte basado en datos del seguimiento durante más de seis años señala que las colonias con un alto número de ácaros varroa en la misma temporada o infectados por *Nosema ceranae* en primavera tienen muchas más posibilidades de padecer brotes de ascosferosis (Hedtke y col., 2011). Esta correlación necesita confirmación experimental, pero aclara la complejidad de la interacción hospedador-agente patógeno en las colonias de abejas de miel, la cual algunos investigadores relacionan con la variación genética existente en las colonias como medida de resistencia en respuesta al genotipo del parásito (Evison y col., 2013). La investigación sobre la interacción con otros agentes patógenos (Vojvodic y col., 2012) y los factores de estrés, tales como la concentración subletal de diversos productos químicos, también se justifica. Recientemente se ha descubierto que los virus DWV, BQCV y IAPV son capaces de infectar y replicarse en el hongo *A. apis*, aunque todavía se desconoce su impacto tanto en el hongo como sobre la abeja (Li y col., 2014).

Varios autores han demostrado que la selección de colonias de abejas con un alto comportamiento higiénico a la hora de detectar y eliminar la cría infectada crea poblaciones menos susceptibles a padecer la enfermedad (Gilliam y col., 1983; Spivak y Reuter, 2001; Palacio y col., 2000), y además observaron que las colonias con este comportamiento tenían una menor frecuencia de enfermedades de la cría incluyendo la ascosferosis.

Al igual que con otras enfermedades de la cría, como la loque americana y europea, las abejas eliminan la cría infectada con sus hábitos de higiene, lo cual es especialmente eficaz para las momias blancas. Aunque tan pronto como los cuerpos fructíferos de *A. apis* se desarrollan, el proceso de limpieza de las abejas propaga las esporas dentro de la colonia. Si las momias no se eliminan rápidamente, las esporas pueden entrar en las celdas de cría conducidas por el aire circulante.

4.1.7. Loque americana (agente *Paenibacillus larvae*)

4.1.7.1. Etiología de la loque americana

La bacteria *Paenibacillus larvae* es el agente etiológico de la loque americana, se trata de una de las enfermedades más virulentas que afectan a la cría de las abejas melíferas, debido a la alta tasa de infección y el gran número de pérdida de colonias que provoca (Hansen y Brødsgaard, 1999).

Esta bacteria es Gram positiva y produce esporas como forma de resistencia. Las células vegetativas tienen forma de bacilo, recto o en ocasiones curvado, con los

extremos redondeados y presentan un tamaño muy variable (0,5-0,8 μm de ancho por 1,5 a 6 μm de largo) pudiendo encontrarse aisladas o formando cadenas; la mayoría de las cepas son móviles y poseen 30-35 cilios vibrátiles de 15 a 30 μm de largo.

La fase vegetativa de la bacteria constituye la fase infecciosa de la enfermedad; las esporas poseen siete capas protectoras (Bakhiet y Stahly, 1985) que le dan un aspecto ovoide, brillante y refringente, con un tamaño de 1,3 x 0,6 μm (Hornitzky y Wilson, 1989 citado por OIE, 2014a), y se caracterizan por su marcado estado de deshidratación y por la considerable reducción de actividades metabólicas para aumentar su resistencia en el medio.

Paenibacillus larvae es capaz de producir un billón de esporas por cada larva infectada y pueden permanecer viables durante 35 años en las escamas formadas por la cría muerta (Haseman, 1961 citado por Govan y col., 1999) e incluso hasta 3 ó 10 años en los materiales y productos de la colmena (miel y cera), gracias a que son extremadamente resistentes a los agentes químicos y al calor.

La clasificación de *P. larvae* (Genersch y col., 2006) como agente etiológico de la loque americana ha sido el centro de grandes discusiones a lo largo de la historia. Esta enfermedad fue descrita en el siglo XVIII, basándose en el olor fétido que desprendían las colonias infectadas, de donde procede su nombre en inglés “*Foulbrood*” que significa cría pútrida o fétida (Schirach, 1769 citado por Forsgren, 2010). Aunque estudios posteriores revelaron que este nombre podría incluir dos enfermedades distintas, loque americana y europea (Dzierzon, 1882 citado por Bailey y Ball, 1991), que afectan a distintos estadios de la cría (operculada y sin opercular respectivamente) y, a su vez, desarrollaban distinta sintomatología.

En un principio se consideró *Bacillus alvei* como el agente causal de la loque americana o enfermedad de la cría fétida (Cheshire y Cheyne, 1885 citado por Forsgren, 2010; Genersch, 2010). Sin embargo, en el año 1906, a partir de larvas enfermas, White aisló una bacteria desconocida a la que denominó *Bacillus larvae* (White, 1906) basándose en su morfología (forma de bastón) y su capacidad para formar endosporas. A continuación, en 1950 se aisló otra bacteria diferente a partir de escamas secas de cría muerta, a la cual se le dio el nombre de *Bacillus pulvificiens* (Katznelson, 1950).

Mediante la realización de análisis taxonómicos, las especies *B. larvae* y *B. pulvificiens* se reclasificaron en el género *Paenibacillus* denominándose respectivamente *P. larvae* y *P. pulvificiens* (Ash y col., 1993). A través del análisis de patrones de restricción de ADN y del estudio del ADN vinculante de un conjunto de cepas de ambas especies, se observó una gran similitud molecular entre ambas especies y por ello se reclasificaron como una única especie con dos subespecies: *P. larvae* subsp. *larvae* y *P. larvae* subsp. *pulvificiens* (Heyndrickx y col., 1996 citado por

Genersch y col., 2006) las cuales presentan diferencias tanto genotípicas como fenotípicas. La combinación del estudio de la morfología y el empleo de métodos moleculares tales como el uso de elementos repetitivos amplificados por PCR (rep-PCR) y de los cebadores ERIC 1R-ERIC 2 (Genersch y col., 2006), condujeron a la reclasificación de una única especie *P. larvae* con cuatro genotipos, sin diferenciación entre subespecies. Los genotipos ERIC I y II corresponden a la subespecie *P. l. larvae*, mientras que los genotipos ERIC III y IV corresponden a la subespecie *P. l. pulvificiens* (Genersch, 2010). Los cuatro genotipos difieren en la morfología de la colonia y de las esporas, en la hemólisis, en su metabolismo de fuentes de carbono, en la capacidad de germinación y su respuesta a los tratamientos térmicos (Forsgren y col., 2008) y, lo más importante, en la virulencia (Genersch y col., 2005; Genersch, 2010; Djucik y col., 2014). Un resumen de las características de los cuatro genotipos ERIC de *P. larvae* se representan en la Tabla 3.

Tabla 3.- Características de los genotipos ERIC I, ERIC II, ERIC III y ERIC IV de *P. larvae* (Genersch y col., 2006)

Especies Genersch y col. (2006)	<i>Paenibacillus larvae</i>			
Subespecies Heyndrickx y col. (1996)	<i>P. l. larvae</i>	<i>P. l. pulvificiens</i>		
Genotipos ERIC	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Patógena (con síntomas de loque americana)	Si	Si	Si	Si
LT ₁₀₀	12 d	7 d	7 d	7 d
Progresión enfermedad como plaga	Si	Si	n.o.	n.o.
Morfología colonia pigmentada	No	Si	Si	No
Hemólisis en CSA	No	No	Si	Si
Fermentación de manitol	No	Si	Si	Si
Fermentación de salicilina	Si	No	No	No

LT₁₀₀: tiempo que requiere el patógeno para matar todos los individuos infectados (Tiempo letal)

CSA: Agar columbia de sangre de oveja

n.o.: no observada

La dosis media infecciosa (LD₅₀ = dosis de esporas en la que el 50% de las larvas mueren) requerida para provocar la infección varía entre $8,49 \pm 1,49$ esporas en larvas de 24-28 horas de edad (Hansen y Brødsgaard, 1999). Estas larvas contraen la infección a través de las abejas nodrizas, bien porque les transmiten las esporas presentes en su tracto digestivo cuando alimentan a las crías; o bien, al contaminar las celdas con las esporas presentes en su superficie corporal al eliminar las larvas infectadas durante sus labores de limpieza. Después de 12 h tras la ingestión, las esporas germinan en el intestino medio de la larva (Bamrick, 1967 citado por Genersch, 2010; Yue y col., 2008) que presenta un pH de 6,5, donde la fase vegetativa de la bacteria comienza a proliferar masivamente sin destruir visiblemente la integridad del epitelio intestinal en la primera etapa de la infección (Yue y col., 2008). Cuando el lumen del intestino

larvario aparece saturado de bacterias patógenas éstas degradan la membrana peritrófica del epitelio intestinal en las últimas fases de la infección (Davidson, 1970 citado por García-González y col., 2014a; Yue y col., 2008) mediante una proteína degradante de quitina llamada PICBP49 (García-González y col., 2014a); finalmente, las formas vegetativas se trasladan al hemocele atravesando el espacio intercelular y una vez allí proliferan de nuevo secretando proteasas altamente activas (Dancer y Chantawannakul, 1997 citado por Genersch, 2010; Hrabák y Martínek, 2007; Antúñez y col., 2010) que servirán para degradar los tejidos de la larva y además forman esporas (Genersch, 2010). La muerte de la larva ocurre por septicemia generalizada al cabo de 11 ó 12 días tras la eclosión del huevo (Tanada y Kaya, 1993).

Cuando la larva muere se descompone en un líquido viscoso (fase filamentosa) de color marrón que desprende un olor muy típico de esta enfermedad similar a la cola de carpintero (Shimanuki, 1990). Esta masa se seca después de varios días y se transforma en una escama dura de color marrón oscuro a negro que se adhiere al fondo y/o las paredes de las celdas, la cual se caracteriza por su alto poder infectivo (Bailey y Ball, 1991), ya que una larva muerta por loque americana en este estado puede llegar a presentar más de $2,5 \times 10^9$ esporas.

4.1.7.2. Epidemiología de la loque americana

Esta enfermedad afecta a las larvas más viejas y a las pupas más jóvenes (Reybroeck y col., 2012). Las larvas pueden morir a una edad temprana, mientras se encuentran enroscadas en la base de la celda de cría sin opercular, y serán eliminadas por las abejas obreras adultas dejando sólo una celda vacía (Brødsgaard y col., 2000). Por el contrario, otras larvas mueren en una etapa más tardía de su desarrollo cuando están en una posición vertical, llenando la mayor parte de la celda de cría. Aunque por lo general, las larvas o pupas morirán después del operculado de la celda.

La susceptibilidad de las larvas a la enfermedad de la loque americana disminuye al aumentar la edad (Woodrow, 1941 citado por Bailey y Ball, 1991); las larvas no pueden ser infectadas 53 horas después de que el huevo haya eclosionado, puesto que las esporas no afectan a las abejas adultas ya que las condiciones de su tracto digestivo (pH 3-3,5) no permiten la germinación de las células vegetativas bacterianas y son eliminadas con las heces fuera del intestino (Wilson, 1971; Hitchcock y col., 1979). Los estadios larvales de las tres castas de abejas son susceptibles a la infección, sin embargo en condiciones normales es poco frecuente encontrar larvas infectadas de reinas y zánganos.

Con su comportamiento higiénico las abejas nodrizas intentan eliminar las larvas muertas y las escamas de las celdillas a través de señales olfativas (Guarna y col., 2015), pero estas labores de limpieza conllevan la difusión de las esporas a otras larvas e incluso a otras colonias o colmenares a través de la deriva, el pillaje de polen y/o miel

contaminados y la visita de zánganos (Delaplane, 1991 citado por Govan y col., 1999; Hornitzky, 1998). El intercambio de cuadros que contienen restos de cría enferma es la forma más común de propagación de la enfermedad a partir de una colonia a otra. Aunque la enfermedad también se puede transmitir entre colonias por la utilización de miel contaminada para la alimentación de las propias abejas (Von der Ohe y Dustmann, 1997 citado por OIE, 2014a; Aydin y col., 1998 citado por Garrido-Bailón, 2012) y el empleo de cera contaminada con esporas de *P. larvae* para producir panales si el tratamiento térmico para fundir la cera no se realiza adecuadamente (120°C durante 30 minutos a 1 bar de presión). Las esporas son extremadamente resistentes al calor y a los agentes químicos, pudiendo permanecer infectantes al menos 35 años en el medio ambiente (Haseman, 1961 citado por Govan y col., 1999). Son resistentes además a las bajas temperaturas y a la ebullición durante 14 min en agua y 30 min en miel. La importación de colonias de abejas y la introducción de reinas procedentes de colonias infectadas pueden difundir la enfermedad entre distintos países.

Paenibacillus larvae es una bacteria cosmopolita mundialmente distribuida (Riessberger-Galle y col., 2001; De Graaf y col., 2006; Genersch y col., 2006) capaz de formar esporas con una alta capacidad infectante y una gran resistencia en el medio. La loque americana es una de las enfermedades más devastadoras de la abeja melífera y aparece en las listas de la OIE (2015) y los países miembros están obligados a declarar su aparición (De Graaf y col., 2013), aunque ya no aparece incluida en el anexo I del RD 526/2014.

Respecto a los 4 genotipos descritos dentro de la especie *P. larvae*, el más frecuente es el genotipo ERIC I y se encuentra en Europa y en América, en cambio el genotipo ERIC II no se limita sólo a Europa como se pensó en un primer momento (Schäfer y col., 2014) y los genotipos ERIC III y IV no se han identificado en el campo durante décadas, pero existen en colecciones de cultivos (Genersch, 2010; De Graaf y col., 2013; Morrissey y col., 2015; Bassi y col., 2015).

La enfermedad es tan contagiosa que avanza de forma progresiva, apareciendo en cualquier época del año, provocando graves consecuencias como una importante disminución de las poblaciones de abejas, pudiendo llegar a destruir en pocos meses o años las colonias de abejas infectadas (Hansen y Brødsgaard, 1999), y su producción de miel siendo capaz de provocar un gran impacto a nivel económico en el sector apícola.

4.1.7.3. Patología de la loque americana

Los signos clínicos de la loque americana son muy diversos y dependen del genotipo implicado, la etapa de la enfermedad y la fuerza de la colonia de abejas (y, posiblemente, su resistencia a la loque americana) (Genersch y col., 2005). Los genotipos ERIC I-IV son todos patógenos para las abejas y, en consecuencia, la detección temprana de la loque americana ayuda a evitar una mayor propagación. Al

comienzo de la enfermedad el debilitamiento de la colonia es bastante lento, por lo que en poblaciones insuficientemente vigiladas no se constata la enfermedad hasta que se hace evidente la falta de actividad. Los últimos hallazgos sugieren que el tripéptido sevadicina, antimicrobiano producido por *P. larvae* (García-González y col., 2014b), podría estar involucrado en la patogénesis de la bacteria actuando como un factor de expresión regulador de la virulencia (Tang y col., 2015), y que la toxina C3larvin podría tratarse de un factor de virulencia de *P. larvae* (Krska y col., 2015).

Los cuadros de cría de colonias infectadas presentan una apariencia en mosaico debido a la mezcla de celdas de larvas sanas operculadas, celdas desoperculadas con los restos de larvas enfermas y celdas vacías donde las larvas infectadas han sido eliminadas. Aunque esto no es una característica única de la loque americana y la loque europea, debe ser tenido en cuenta como diagnóstico diferencial. Las celdas operculadas que contienen una larva enferma presentan un opérculo con aspecto húmedo y oscuro, pudiendo aparecer hundidos y perforados a medida que la infección progresa.

El color de las larvas o pupas infectadas cambia de blanco a marrón crema y luego a un color marrón oscuro con apariencia viscosa que puede formar hilos que se estiran más de 2,5 cm al introducir un palillo a través del opérculo de la cría infectada y extraerlo. Esto se conoce con el nombre de “prueba de la cerilla” y probablemente es la técnica más empleada para el diagnóstico en campo de la enfermedad, pero en algunos casos los restos de esas larvas son bastante acuosos produciendo un falso negativo en la prueba de la cerilla. Un mes o más después de que la cría adquiera una consistencia viscosa, finalmente se seca para formar escamas quebradizas que se adhieren fuertemente a los lados inferiores de la celda y que son altamente infectantes (Genersch, 2010).

Si la muerte se produce en la fase de pupa, se forma un filamento pupal como un saliente que se extiende desde la cabeza de la pupa a la parte superior de la celda de cría, y puede persistir también cuando se adquiere la forma de escama. La formación de un filamento pupal en el fondo de la celda es uno de los signos más característicos de la enfermedad, a pesar de que rara vez se aprecia y precede a la formación de las escamas.

Recientemente, se ha demostrado que los distintos genotipos difieren en su virulencia puesto que las cepas ERIC I producen el 100% de mortalidad de las larvas infectadas al cabo de 12 días, mientras que las cepas ERIC II matan larvas infectadas en aproximadamente 7 días (Genersch y col., 2005; Genersch, 2010; Djucik y col., 2014). Parece ser que a las abejas nodrizas les cuesta más reconocer las larvas muertas por esta enfermedad después del operculado de las celdas (Rauch y col., 2009). Por lo tanto, la proporción de larvas infectadas transformándose en masa viscosa bajo las

celdas operculadas es mayor para las infecciones con cepas de genotipo ERIC I. Tanto el veterinario como el apicultor buscará una masa viscosa dentro de las celdas operculadas como principal signo de la enfermedad, por lo tanto es probable encontrar un diagnóstico con falsos negativos si las colonias están infectadas con cepas de genotipo ERIC II porque en este caso habrá muy pocas celdas infectadas (Genersch, 2010; Rauch y col., 2009).

4.1.7.4. Diagnóstico de la loque americana

El diagnóstico de la loque americana se basa en la identificación del agente patógeno, *P. larvae*, y la presencia de los signos clínicos anteriormente mencionados. El diagnóstico se puede realizar en varios tipos de muestras: cuadros de cría (20 cm²) con cría muerta si es posible, jalea real, miel (Ritter y Kiefer, 1995), polen (Gochnauer y Corner, 1987 citado por OIE, 2014a), obreras adultas (Lindström y Fries, 2005) y restos de cera (Titera y Haklova, 2003). La elección dependerá de si se trata de una colonia enferma o un examen preventivo. Las técnicas implicadas en la identificación de *P. larvae* son la microscopía, el perfil bioquímico, la caracterización microbiológica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas basadas en anticuerpos. Algunos de estos métodos de identificación requieren una etapa de cultivo anterior, mientras que otros se pueden realizar directamente en las muestras recogidas.

1. Examen microscópico

Las técnicas microscópicas que se emplean con más frecuencia son, por un lado, la tinción de Gram sobre un frotis de bacterias de colonias aisladas y, por otro lado, la tinción con carbolfucsina en frotis larvales, que puede confirmar la enfermedad clínica basada en la morfología de las esporas (Hornitzky y Wilson, 1989 citado por OIE, 2014a).

2. Perfil bioquímico

Paenibacillus larvae se caracteriza por ser anaerobio facultativo y su perfil bioquímico se basa en la prueba de la catalasa para la cual resulta ser negativo o positivo de forma retardada, dependiendo del genotipo implicado, ya que las bacterias pueden perder su actividad catalasa con la edad llegando a producir falsos negativos para esta reacción. La producción de ácido a partir de carbohidratos y la hidrólisis de la caseína dependiendo del genotipo implicado, produce ácido aeróbicamente a partir de glucosa y trehalosa, pero no a partir de arabinosa y xilosa (Alippi, 1992), aunque los resultados pueden variar con la fermentación del manitol y salicina dependiendo de los distintos genotipos (Genersch y col., 2005; 2006) así como la hemólisis en el medio agar columbia con sangre de oveja. También pueden hidrolizar la caseína o la leche (Schuch y col., 2001).

También existen kits comerciales disponibles para la caracterización bioquímica de *P. larvae* tales como *API 50 CHB* (Carpana y col., 1995), *BBL CRYSTAL* (Dobbelaere y col., 2001a) y *Biolog system* (Neuendorf y col., 2004).

3. Cultivo microbiológico

Se han desarrollado diferentes medios sólidos para el cultivo de *P. larvae*: agar de crecimiento Mueller-Hinton (MYPGP) (Dingman y Stahly, 1983), J-agar (Hornitzky y Nicholls, 1993), agar infusión de cerebro-corazón (BHI) (Gochnauer, 1973) y agar columbia con sangre de oveja (CSA) (Hornitzky y Karlovskis, 1989 citado por OIE, 2014a; Nordström y Fries, 1995). Otros medios utilizados para el cultivo de *P. larvae* son agar *P. larvae* (PLA) (Schuch y col., 2001), que presenta la ventaja de inhibir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos presentes habitualmente en la colmena y en los productos de la abeja aunque se ha descrito la liberación de paenilamicinas por parte de *P. larvae* para evitar el crecimiento de posibles bacterias competidoras (Müller y col., 2014; García-González y col., 2014c) y paenilarvinas con función antifúngica (Sood y col., 2014), y agar T-HCl-YGP (Steinkraus y Morse, 1996) que es el medio utilizado para el cultivo de *P. larvae* a partir de la miel. Cuando se parte de larvas enfermas, es necesario añadir al medio de cultivo ácido nalidíxico para evitar el crecimiento de *P. alvei* u otras bacterias contaminantes de los géneros *Bacillus* y *Brevibacillus* (Hornitzky y Clark, 1991). Mientras que cuando se utiliza la miel como muestra de partida la adición de ácido pipemídico (Alippi, 1991; 1995) evita la contaminación con otras bacterias formadoras de esporas.

La bacteria se siembra en placas de cultivo que se incuban a 36°C durante 2-4 días en condiciones de microaerofilia (5% CO₂) y la morfología de las colonias obtenidas es muy característica, pero depende en gran medida del medio de cultivo utilizado (OIE, 2014a):

En el medio agar *Paenibacillus larvae* (PLA), las colonias de *P. larvae* son pequeñas, de color verde pálido a amarillo (el mismo color que el medio), con una ligera opacidad y una superficie áspera; a veces el centro se eleva.

En los medios agar de crecimiento Mueller-Hinton (MYPGP) y J-agar, las colonias son pequeñas, rugosas, planas o elevadas y de color blanquecino o color crema.

En el medio agar columbia con sangre de oveja (CSA), las colonias son pequeñas, regulares, de aspecto mantecoso y de color grisáceo brillante.

También se han observado colonias de color rojizo y/o naranja, producidas por los genotipos ERIC II y III en MYPGP, J-agar y CSA (Genersch y col., 2005; 2006; Neuendorf y col., 2004). Debido a la gran variabilidad en la morfología de las colonias, se recomienda el uso de cepas de referencia de *P. larvae* (De Graaf y col., 2013).

A veces la morfología de la colonia no es concluyente, pero puede servir para seleccionar las colonias de bacterias para su posterior identificación.

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipado

La OIE (2014a) recomienda dos técnicas moleculares para el diagnóstico de la loque americana basadas en el gen 16S del ARNr (De Graaf y col., 2006; 2013). Por un lado, la PCR desarrollada por Dobbelaere y col. (2001b) se puede usar para una confirmación rápida de un cuadro de cría con signos clínicos y para la identificación de las colonias de bacterias después de un cultivo; y, por otro, la PCR anidada propuesta por Lauro y col. (2003) que permite el análisis directo de la solución de esporas. También existe una técnica de PCR múltiplex desarrollada por Garrido-Bailón y col. (2013) que amplifica *P. larvae* al mismo tiempo que *M. plutonius* y *A. apis*.

A lo largo de estos últimos años se han desarrollado otras técnicas moleculares orientadas a la discriminación entre los distintos genotipos. De todos ellos, el método más utilizado es la amplificación de elementos repetitivos por PCR o rep-PCR (Versalovic y col., 1994), ya que se trata de un método altamente discriminatorio y fácil de usar e interpretar. La pareja de cebadores ERIC1R-ERIC2 permiten la diferenciación de los 4 genotipos (ERIC I, II, III y IV) (Genersch y col., 2006). Para mejorar la discriminación de los genotipos, la utilización de cebadores ERIC se puede complementar con el uso de otras parejas de cebadores (De Graaf y col., 2013), tales como los BOXA1R que permiten la discriminación de los cuatro patrones de las bandas en América, todos ellos pertenecientes al genotipo ERIC I y tres en Europa (Genersch y Otten, 2003 ; Alippi y col., 2004), REP1R-I y REP2-I, y MBO-REP1 (Peters y col., 2006); Cuando se utilizaron cebadores REP, se encontraron cuatro patrones de bandas en América y Europa, aunque los resultados no pudieron ser comparados ya que se utilizaron diferentes pares de cebadores. No obstante, debe tenerse en cuenta que los cebadores BOX B1 y BOX C1 no amplifican ADN de *P. larvae* (Genersch y Otten, 2003).

Los métodos más recientes incluyen PCR a tiempo real para identificar y cuantificar *P. larvae* (Han y col., 2008; Chagas y col., 2010; Martínez y col., 2010; Rivière y col., 2013).

Durante la última década los métodos basados en el análisis genético han ganado una mayor importancia. Diferentes estrategias se han utilizado para determinar la diversidad genética de *P. larvae*, incluyendo patrones de fragmentos de endonucleasas de restricción (Djordjevic y col., 1994; Alippi y col., 2002), electroforesis en gel de campos pulsantes o PFGE (Wu y col., 2005; Genersch y col., 2006), polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción o RFLP (De Graaf y col., 2006), ribotipificación y electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización (Antúñez y col., 2007).

5. Técnicas basadas en anticuerpos

Se han desarrollado diferentes técnicas basadas en anticuerpos para el diagnóstico de la loque americana, que pueden ser utilizados para la identificación de las colonias bacterianas resultantes de un cultivo previo o para el examen directo de muestras con sospechas de enfermedad. La mayoría de estos métodos se basan en suero de conejo policlonal desarrollado en cultivos puros de *P. larvae*. Algunos de estos métodos emplean técnicas de inmunodifusión (Peng y Peng, 1979) o anticuerpos marcados con un fluorocromo (Otte, 1973). En cambio, también existe una técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) que emplea un anticuerpo monoclonal específico para *P. larvae* (Olsen y col., 1990) y, hoy en día, se comercializa un dispositivo de flujo lateral para la confirmación rápida de loque americana conocido como *VITA diagnostic kit*® (<http://www.vita-europe.com/>).

6. Espectrometría de masas

El dispositivo MALDI-TOF MS emplea el ácido cinamónico como matriz a la que se le añade una colonia bacteriana y detecta espectros de masa específicos de péptidos ribosómicos bacterianos. Identifica la cepa bacteriana tras realizar la comparación de los espectros detectados con la base de datos de espectros conocidos.

4.1.7.5. Tratamiento y control de la loque americana

Debido a que las esporas pueden permanecer viables en el medio hasta 35 años, muchos países exigen que las colonias de abejas con loque americana sean incineradas. Mientras que otros países como Estados Unidos, Canadá y Argentina permiten el uso de antibióticos para mantener la enfermedad bajo control. Los antibióticos sólo pueden mitigar la sintomatología, pero no eliminan la enfermedad y, por tanto, las colmenas infectadas deben ser tratadas constantemente para evitar un brote de loque, ya que si no son tratadas la loque producirá la muerte de las colonias pudiendo aniquilar un apiario por completo (Hertlein y col., 2014).

La mayoría de las especies del género *Paenibacillus*, incluyendo *P. larvae*, son altamente susceptibles a las tetraciclinas y, por ello, el antibiótico más empleado por los apicultores para prevenir y controlar la loque americana en las colonias de abejas es la oxitetraciclina (OTC), como una alternativa a la quema de colmenas infectadas en las zonas de mayor incidencia de la enfermedad. Sin embargo, el uso masivo y persistente de este antibiótico durante décadas ha dado lugar a cepas de *P. larvae* resistentes a este medicamento a través de mecanismos de transferencia horizontal (Djukic y col., 2014) o inducida por la presencia de concentraciones subinhibidoras de la tetraciclina (Alippi y col., 2007; 2014). Fenotipos altamente resistentes a *P. larvae* se han correlacionado con la presencia de plásmidos naturales que llevan diferentes

determinantes de resistencia Tc, incluyendo genes Tetk y TetL (Murray y Aronstein, 2006).

Debido a la falta de consenso para permitir el uso de antibióticos en el tratamiento de colonias infectadas y a la aparición de resistencias hacia ciertos medicamentos, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la eficacia de algunos extractos de aceites esenciales de origen vegetal (Alippi y col., 1996; Reyes y col., 2013; Hernández-López y col., 2014a) o de propóleos (Antúnez y col., 2008; Bastos y col., 2008; Mihai y col., 2012; Boonsai y col., 2014; Wilson y col., 2015) para controlar la enfermedad después de comprobar si producían toxicidad en abejas (Albo y col., 2003). También se han utilizado aislados de bacterias del ácido láctico a partir de comida fermentada para prevenir la loque americana ya que aumentan la respuesta inmune de las abejas (Yoshiyama y col., 2013). No obstante, aún son necesarios más estudios para averiguar qué componentes intervienen en la inhibición del crecimiento de *P. larvae*, así como la dosis y modo de aplicación en campo en que deben aplicarse, puesto que en algunos casos se ha observado un cierto grado de toxicidad para abejas. Parece ser que algunos tipos de miel pueden conferir cierta “inmunidad social” a la colonia, debido a los efectos antimicrobianos presentes en el néctar de determinadas flores (Erler y col., 2014).

Si la infección es moderada sin síntomas clínicos, se recomienda sacudir el enjambre como método de tratamiento (Von der Ohe, 2003).

Para evitar la propagación es muy importante aplicar medidas de manejo adecuadas, tales como: la eliminación de colonias con síntomas, el aislamiento y la esterilización de materiales de colonias infectadas, evitar usar la miel para la alimentación de las abejas; la selección de abejas con carácter higiénico también ayuda a prevenir la enfermedad. Formar parte activa de programas de vigilancia del diagnóstico, que consisten en la toma de muestras de forma periódica para detectar loque americana en colonias que no presentan signos clínicos, puede ayudar a prevenir y controlar la enfermedad en zonas susceptibles a padecer loque americana como demostró Antúnez y col. (2012a) en un estudio de la prevalencia y distribución de esta bacteria en Uruguay (administración preventiva con extracto etanólico del propóleo, donde el tratamiento con antibióticos no está permitido) reduciendo su incidencia a lo largo de una década de estudio.

Aún no ha sido muy estudiado en abejas, pero sí en otros insectos sociales en los cuales posiblemente intervengan mecanismos de inmunidad adquiridos a través de las generaciones, de manera que la experiencia inmune adquirida por la madre, reina en este caso, ante la exposición a un patógeno pueda ser transmitida a la progenie (Hernández-López y col., 2014b).

4.1.8. Loque europea (agente *Melissococcus plutonius*)

4.1.8.1. Etiología de la loque europea

La loque europea es una enfermedad bacteriana grave causada por la bacteria *Melissococcus plutonius* y que afecta a la cría de la abeja melífera, aunque otras especies del género *Apis* también pueden contraer la enfermedad como *A. cerana* (Bailey, 1974 citado por Forsgren, 2010), *A. laboriosa* (Allen y col., 1990) y *A. florea* (Saraithong y col., 2015). En un principio, Cheshire y Cheyne (1885 citado por Forsgren, 2010) consideraron a *Bacillus alvei* como el causante de la loque europea, aunque en 1912 White (citado por Forsgren, 2010) renombró a esta bacteria como *Bacillus pluton* describiéndola en base a su morfología observada al microscopio. A continuación, Bailey (1957) consiguió cultivarla dándole el nombre de *Streptococcus pluton*. El bajo contenido de las bases guanina y citosina encontradas en su ácido nucléico justificaron la incorporación de esta especie en un nuevo género con una única especie: *Melissococcus pluton* (Bailey y Collins, 1982; Allen y Baill, 1993). Finalmente la bacteria fue rebautizada como *Melissococcus plutonius* (Truper y de Clari, 1998). El análisis comparativo de la secuencia genética de esta bacteria mostró una estrecha relación filogenética entre el género *Enterococcus* y *M. plutonius* (Cai y Collins, 1994).

Melissococcus plutonius es una bacteria Gram positiva que no forma esporas. En algunas ocasiones presenta forma de cocos lanceolados con un tamaño de 0,5 x 1 µm aunque su naturaleza es pleomórfica, pudiendo aparecer de forma aislada, en grupos o formando cadenas de longitud variable.

Las células bacterianas son ingeridas por las larvas junto con los alimentos contaminados (Shimanuki, 1997). Cuando las bacterias alcanzan el intestino medio (pH 6,5) de la larva, se instalan entre la membrana peritrófica y el alimento, y comienzan a proliferar (Bailey, 1983). En esta primera fase de la infección la enfermedad es asintomática. Cinco días más tarde el intestino larvario está repleto de bacterias que provocan la ruptura de la membrana peritrófica y según va progresando la infección van invadiendo el resto del epitelio intestinal.

Las larvas infectadas pueden morir antes o después de la operculación, o incluso pueden pupar y formar adultos normales o de tamaño inferior con éxito. Las larvas muertas en las celdas sin opercular aparecen retorcidas alrededor de las paredes de la celda o estiradas longitudinalmente. Estas larvas adquieren una consistencia de masa más o menos fibrosa y filante con hilos de menos de 1,5 cm de largo de color marrón amarillento (Shimanuki, 1997), luego marrón y finalmente se descomponen adoptando un color negro grisáceo (Forsgren, 2010).

La muerte de la larva infectada puede acelerarse en presencia de bacterias secundarias tales como *Enterococcus faecalis*, *Achromobacter euidice*, *Paenibacillus*

alvei y *Brevibacillus laterosporus*, aunque el papel de estos invasores bacterianos secundarios en el desarrollo de la enfermedad ha sido poco investigado (Forsgren, 2010). Sin embargo, estas bacterias causan una serie de síntomas que pueden enmascarar la enfermedad y dificultar el correcto diagnóstico de campo puesto que influyen en gran medida en el olor y la consistencia de las larvas muertas.

4.1.8.2. Epidemiología de la loque europea

Las larvas de las abejas melíferas pueden contraer loque europea en cualquier fase de su desarrollo, aunque *M. plutonius* afecta principalmente a la cría sin opercular siendo el momento óptimo a las 48 h de edad larvaria o incluso antes. Sin embargo, también puede ser detectada en larvas y pupas sin ningún síntoma clínico (Forsgren y col., 2005). Aproximadamente unas cien unidades formadoras de colonias (UFC) son necesarias para producir la infección en la larva (Bailey, 1960 citado por Forsgren 2010). Por el contrario, la infección por *M. plutonius* no es siempre letal, ya que se ha observado que algunas larvas infectadas alcanzan la fase de pupa a un ritmo más lento (McKee y col., 2004). Estas pupas infectadas defecan en las celdas, dejando así las bacterias en los panales y haciendo que estos puedan ser contagiosos durante años. Aunque esta bacteria no produzca esporas es capaz de sobrevivir largos períodos de desecación, tanto en las heces y restos larvarios de las celdillas como en los restos de celdas que caen al fondo de la colmena (Bailey, 1959 citado por Forsgren 2010; Bailey 1981, 1983).

El contagio de esta enfermedad tiene lugar cuando las abejas nodrizas, intercambian comida con sus congéneres por trofalaxia después de limpiar las celdillas contaminadas, puesto que llevan estas bacterias en su aparato bucal y finalmente las transmiten nuevamente a las larvas cuando son alimentadas por las nodrizas (Bailey y Ball, 1991; Shimanuki, 1990).

La loque europea afecta a las abejas melíferas, causando graves pérdidas de cría y reduciendo la producción de miel, conduciendo al colapso de las colonias. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, siendo endémica en muchas áreas y produciendo brotes estacionales de manera ocasional, mientras que se trata de un problema creciente en algunos países en los cuales su incidencia ha ido en aumento con el paso de los años como es el caso de Suiza, donde su incidencia se ha incrementado desde finales de los 90, o en Noruega, donde se detectó un brote regional en 2010 después de 30 años sin la enfermedad (Forsgren y col., 2005; Roetschi y col., 2008). Estos hechos demuestran que la capacidad que tiene *M. plutonius* para causar mortalidad en las larvas varía en severidad según las zonas geográficas (Wilkins y col., 2007; Dahle y col., 2011 citado por Forsgren y col., 2013; Grangier, 2011; Arai y col., 2012; Charrière y col., 2011 citado por Forsgren y col., 2013).

La loque europea, como la loque americana, aparece en el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (2015) y tampoco es nombrada en el anexo I del RD 526/2014. Esta enfermedad está distribuida en la mayoría de áreas donde se practica la apicultura, excepto en Nueva Zelanda (Matheson, 1993; Ellis y Munn, 2005; OIE, 2010).

Tanto las abejas nodrizas del interior como las pecoreadoras aparentemente sanas pueden contener una alta carga bacteriana (Roetschi y col., 2008), y ejercer de portadoras en la transmisión de la enfermedad entre colonias y apiarios (McKee y col., 2003; Belloy y col., 2007). La mayoría de las veces, la enfermedad se manifiesta durante el período de mayor crecimiento de las colonias y, por lo tanto, la alta densidad de colmenas y apiarios debe tenerse en cuenta como factor que favorece el contagio de loque europea (Belloy y col., 2007). Otros estudios ofrecen evidencias de que la transmisión de *M. plutonius* también puede ocurrir a través de la mordeduras del ácaro *V. destructor* (Kanbar y Engels, 2003).

La recogida de miel contaminada (Hornitzky y Smith, 1998 citado por Forsgren, 2010; McKee y col., 2003) mediante el pillaje, las prácticas apícolas rutinarias y la trashumancia también pueden contribuir a una rápida distribución de la enfermedad entre distintas colonias y colmenares.

La loque europea tiene carácter estacional, atacando a las poblaciones de abejas principalmente en primavera o principios de verano y ocasionalmente en otoño con la aparición de brotes repentinos, más o menos severos, que desaparecen unas pocas semanas después (Bailey, 1983).

4.1.8.3. Patología de la loque europea

Aunque el agente causante de la loque europea fue descrito hace casi un siglo, aún se desconocen muchos aspectos de su patogénesis.

El signo más claro y frecuente es la muerte de las larvas poco antes de ser operculadas en sus celdas, pero es poco fiable ya que la muerte también puede deberse a otras causas distintas a la loque europea. La mayoría de las colonias infectadas presentan pocos signos visibles, los cuales a menudo disminuyen por sí solos de forma rápida y espontánea antes del final de cada temporada activa.

Por lo tanto, el diagnóstico de campo de la loque europea se basa en la inspección visual de los panales de cría y la detección de larvas infectadas. En estos casos, el panal de cría presenta un patrón de la cría “en mosaico”, puesto que las abejas nodrizas expulsan de la colonia a las larvas que mueren antes del operculado de la celdilla, dejando celdas vacías diseminadas al azar entre las crías restantes.

Las larvas más jóvenes que mueren a causa de la infección se quedan en la parte inferior de la celda y son casi transparentes, permitiendo la observación de la tráquea. En cambio, las larvas que mueren más tarde aparecen flácidas y mal colocadas en sus celdas, retorcidas entre las paredes o estiradas longitudinalmente. Los síntomas aparecen a los 4-5 días de edad larvaria, matándolas normalmente a esta edad; por tanto, las larvas más viejas son las menos afectadas por la infección (Bailey y Ball, 1991).

La mayoría de las larvas enfermas son detectadas rápidamente y retiradas por las abejas nodrizas. Las larvas infectadas que escapan a la detección de las abejas adultas y mueren después de la operculación de la celda, presentan unos opérculos hundidos e incluso perforados. Estas larvas afectadas, pierden turgencia y presentan cambios de color, desde el blanco al amarillo claro, acompañados frecuentemente por una pérdida en la segmentación. A medida que progresa la infección, el color de la larva cambia nuevamente, con tonos que van desde el marrón grisáceo al negro cuando ya están descompuestas (Bailey, 1960 citado por Forsgren, 2010), convirtiéndose al mismo tiempo en una masa semilíquida. En la última etapa de la enfermedad, la larva se seca y forma escamas de color marrón oscuro que no se adhieren a las paredes de la celda, a diferencia de lo que ocurre en la loque americana; en este caso pueden extraerse fácilmente de las celdas (Llorente, 2003).

Las colonias gravemente afectadas pueden tener un olor muy rancio o agrio, algunas veces ácido como el vinagre, pero a menudo no hay olor. *Enterococcus faecalis*, como bacteria secundaria asociada a esta enfermedad, es responsable del olor agrio encontrado a veces en la loque europea. *Paenibacillus alvei* también puede estar asociado con la presencia de olor, pero no aparece en todos los casos.

Sin embargo, algunas larvas infectadas sobreviven, alcanzan la fase de pupa y se convierten en adultos con un tamaño normal o ligeramente inferior. Estas larvas que sobreviven son capaces de defecar y sus heces infectadas contribuyen a la propagación constante de la enfermedad, haciendo que la infección permanezca de forma enzoótica dentro de las colonias individuales, debido a la contaminación mecánica de los panales de miel por microorganismos resistentes. Por lo tanto, pueden esperarse repeticiones de la enfermedad en años posteriores.

4.1.8.4. Diagnóstico de la loque europea

Los síntomas de la loque europea pueden ser fácilmente confundidos con otras enfermedades o anomalías en las crías, lo que dificulta su diagnóstico. La presencia de *M. plutonius* se puede detectar en muestras de cría, abejas, miel y polen, existiendo además una prueba de campo para la detección de esta bacteria en extractos de larvas (Tomkies y col., 2009).

El diagnóstico puede comenzar con una inspección visual de las colonias en el colmenar, aunque debido a las dificultades anteriormente comentadas y puesto que se trata de una enfermedad de declaración obligatoria, se debe realizar una confirmación laboratorial mediante los siguientes métodos propuestos por la OIE (2008d; 2014b):

1. Examen microscópico

Puede ser verificada por el examen microscópico de las preparaciones de cría por medio de un frotis (Hornitzky y Smith, 1998 citado por Forsgren, 2010).

Los métodos empleados para la identificación de *M. plutonius* son la tinción carbol fucsina y tinción de Gram de frotis preparados a partir de cría enferma.

Para el diagnóstico microbiológico se emplean las larvas recién muertas, ya que es probable que las preparaciones similares, hechas con suspensiones acuosas de larvas enteras muertas o en descomposición, presenten una población variada de bacterias, entre las que *M. plutonius* es muy difícil de distinguir. Por lo tanto, antes de que tenga lugar la descomposición, se debe realizar un frotis de las larvas muertas en el portaobjetos o se separan apretando la cutícula en el centro del cuerpo con unas pinzas que luego se retiran. El contenido del intestino medio se deja expuesto en el portaobjetos, dentro de la membrana peritrófica transparente y gelatinosa. Ésta está parcial o casi totalmente llena de bacterias que pueden verse fácilmente formando agrupaciones de color tiza opaco. El intestino medio de las larvas sanas, que son de más difícil disección, tiene un color marrón dorado. Las larvas aparentemente sanas contienen una mezcla de bacterias y de polen. El intestino medio de las larvas sanas, que contiene mucho polen de color brillante, puede parecerse a los intestinos llenos de bacterias.

Para preparar la tinción se toma una pequeña cantidad de suspensión acuosa del contenido del intestino medio con un asa de siembra, y se mezcla en un portaobjetos con una pequeña cantidad de nigrosina acuosa al 5%. La mezcla se extiende sobre uno o dos centímetros cuadrados, se seca poco a poco sobre una llama y se examina directamente con un microscopio de gran potencia. La presencia de numerosos estafilococos lanceolados, de aproximadamente 0,5-1,0 μm de tamaño, que se presentan individualmente o en grupos, dispuestos en pares o en cadenas cortas, es suficiente para dar un diagnóstico casi seguro de la loque europea. Con frecuencia pueden aparecer bacterias asociadas con la loque europea y que pueden confundirse con *M. plutonius*, como por ejemplo:

Enterococcus (= *Streptococcus*) *faecalis*: Se parece mucho morfológicamente a *M. plutonius* y a menudo se confunde con él. *Enterococcus faecalis* no se multiplica en las larvas de las abejas en ausencia de *M. plutonius*, así que su presencia en gran

número puede ser considerada como una evidencia presuntiva de la presencia de loque europea.

Paenibacillus alvei: Bacilos vegetativos de $2,0\text{—}7,0 \times 0,8\text{—}1,2\ \mu\text{m}$ con flagelos y esporulación con esporas adyacentes. Los bacilos y las esporas son más largos que los de *Paenibacillus larvae*. *Paenibacillus* (= *Bacillus*) *alvei* es generalmente más común que *E. faecalis* en las colonias afectadas por la loque europea, pero no está invariablemente asociado con la enfermedad y no puede actuar como un indicador fiable de la misma. *Paenibacillus alvei* forma esporas muy resistentes en los restos de larvas en descomposición, y se asocia a las colonias de abejas con loque europea enzoótica. Esta bacteria produce un característico olor a rancio.

Bacterium eurydice: Bacilos delgados y rectangulares *in vivo* que pueden formar cadenas de estafilococos muy similares a *M. plutonius in vitro* en algunos medios.

2. Perfil bioquímico

Es una bacteria microaerofílica o anaeróbica que necesita CO_2 para su crecimiento, así como la presencia de lisina, cisteína, peptona o extracto de levadura. Crece en un rango de pH de 7 a 9, con una temperatura óptima de 35°C . Fermenta los azúcares: glucosa, fructosa y manosa, siendo el resultado variable en el caso de la maltosa y la salicina. No utiliza el citrato y no crece en medios de cultivo básicos.

3. Cultivo microbiológico

El medio tradicional para realizar un diagnóstico de la loque europea es el aislamiento e identificación del microorganismo causal. Este puede distinguirse fácilmente de todas las demás bacterias asociadas con las abejas por sus exigentes condiciones de cultivo.

Hay medios selectivos para el cultivo de *M. plutonius* (Bailey, 1957; Bailey, 1983; Bailey y Collins, 1982; OIE, 2014b), pero el cultivo de la bacteria puede ser difícil y existen algunas pruebas de que las muestras de *M. plutonius* de diferentes regiones tienen una respuesta diferencial al cultivo (Allen y Ball, 1993; Arai y col., 2012).

Melissococcus plutonius puede cultivarse en un medio específico (OIE 2008d) compuesto por: extracto de levadura o ciertas peptonas, cisteína o cistina, glucosa o fructosa, almidón soluble, KH_2PO_4 , y agar con un pH 6,6. Las placas con el medio de cultivo se siembran con suspensiones acuosas diluidas de larvas muertas, o preferiblemente, de los intestinos medios de larvas muertas. La cepa de referencia también debe cultivarse en paralelo con las muestras sospechosas para garantizar que los medios funcionan correctamente.

Las placas deben incubarse anaeróbicamente, por ejemplo en jarras McIntosh o Fildes, en una atmósfera de aproximadamente 5-10% de dióxido de carbono (CO_2) a

35°C (OIE, 2008d). Generalmente aparecen pequeñas colonias de *M. plutonius* de un color blanco opaco a los 4 días. Esta bacteria es en cierto modo pleomórfica *in vitro*, apareciendo con frecuencia en forma de bacilo. El pH final del medio puede alcanzar 5,5. El CO₂ es esencial para su crecimiento.

Enterococcus faecalis crece bien *in vitro* bajo las mismas condiciones que *M. plutonius*, pero puede diferenciarse rápidamente por su habilidad para crecer aeróbicamente. Forma pequeñas colonias transparentes en 24 horas y es un anaerobio facultativo. Se multiplica en gran variedad de los medios más comunes, con o sin carbohidratos o CO₂. El pH final en presencia de glucosa es 4,0. *Enterococcus faecalis* rara vez sobrepasa en número a *M. plutonius* en las larvas de abeja y puede diluirse normalmente. Cuando no se diluye, produce ácido suficiente para prevenir la multiplicación *in vitro* de *M. plutonius*.

Las características de cultivo de *B. eurydice* se parecen mucho a las de *Corynebacterium pyogenes* (Jones, 1975), y su multiplicación es muy pobre en forma de bacilos delgados bajo las condiciones necesarias para el cultivo de *M. plutonius*.

Paenibacillus alvei se multiplica de forma muy pobre bajo las condiciones necesarias para el crecimiento *in vitro* de *M. plutonius*. Crece dando lugar a colonias transparentes, algunas de las cuales son móviles y forman arcos sobre la superficie del agar. Los cultivos tienen un olor ácido característico que se asocia con la loque europea cuando el bacilo está presente. Las esporas se forman rápidamente.

4. Técnicas inmunológicas

Ensayos basados en la inmunología, tales como inmunoensayo enzimático-sorbente (ELISA) (Pinnock y Featherstone, 1984) se han publicado y utilizado para la detección y cuantificación de *M. plutonius*.

La bacteria aislada puede ser identificada y diferenciada por medio de simples pruebas de aglutinación en tubo.

Para la identificación de *M. plutonius*, los anticuerpos policlonales contra este microorganismo se pueden preparar en conejos mediante inoculación intravenosa de cultivos lavados de *M. plutonius* (Bailey y Gibbs, 1962) o por una sola inoculación intramuscular de 1 ml de suspensión de antígeno mezclada con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (OIE, 2008d). Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante la inyección en ratones como se describe por Tomkies y col. (2009).

Los ensayos se hacen mediante pruebas de aglutinación en tubos que contienen suspensiones de las bacterias equivalentes a 0,25 mg de peso seco por

mililitro. Los títulos finales son leídos una vez que los tubos han sido incubados durante 24 horas a 37°C.

El método ELISA, directo o indirecto, descrito por Pinnock y Featherstone (1984) es incapaz de detectar los niveles de bacterias de menos de 10^5 células por ml.

Recientemente se ha elaborado un dispositivo de flujo lateral para la detección de *M. plutonius*, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. El kit fue diseñado por Vita (Europe) para la confirmación de síntomas de enfermedad en el campo obteniendo un resultado inmediato (Tomkies y col., 2009 y los protocolos están disponibles en: <http://www.vita-europe.com>). Sin embargo, sólo funciona con una única larva y requiere conocimiento de campo para seleccionar las larvas correctamente infectadas en una muestra de cría (*VITA diagnostic kit*®).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporciona umbrales inferiores de detección que la técnica ELISA, y se ha utilizado con éxito para la detección de *M. plutonius* desde finales de 1990.

También está disponible la reacción en cadena de la polimerasa semi-anidada. Esta permite el examen directo de las larvas, las abejas adultas y los productos de la abeja melífera.

Es posible identificar la presencia de *M. plutonius* en ausencia de síntomas de la enfermedad mediante PCR cuantitativa (Budge y col., 2010; Evans y col., 2013). Este método proporciona la cuantificación robusta de *M. plutonius* y es una herramienta potencialmente útil para ayudar a predecir el riesgo de una colonia, ya sea antes del desarrollo de la enfermedad o, en ausencia de una inspección para confirmar la enfermedad.

Existen varios protocolos para la detección y cuantificación de *M. plutonius* mediante PCR: una PCR convencional para la detección de larvas enfermas (Govan y col., 1998), una PCR múltiple en la que se incluye *M. plutonius* y dos patógenos más (Garrido-Bailón y col., 2013), una PCR anidada sobre el gen 16S del ARNr (Djordjevic y col., 1998) y varias técnicas de PCR cualitativa sobre el gen *sodA* (Ha y col., 2006; Roetschi y col., 2008) y el gen 16S del ARNr (Budge y col., 2010). Los resultados obtenidos indican que la PCR es mucho más sensible que el ELISA y el cultivo, ya que puede detectar células bacterianas no viables y aquellas que no crecen en medio de cultivo. Sin embargo, es evidente que aún está por debajo del nivel de detección en las colonias de abejas de miel (Budge y col., 2010).

Los ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación (qPCR) de *M. plutonius* (Roetschi y col., 2008; Budge y col., 2010; Rivière y col., 2013) se han utilizado para

analizar muestras mezcladas de las obreras nodrizas de varias colonias en un apiario como una alternativa sugerida a la rutina de control de cría visual (Roetschi y col., 2008). El método de PCR cuantitativa también se puede utilizar como diagnóstico preventivo en muestras sin signos clínicos de colmenas en situación de riesgo (Budge y col., 2010; Grangier, 2011). Sin embargo, en algunos territorios, los costos de dicha selección preliminar, utilizando PCR en tiempo real, pueden hacer que este estudio no sea económicamente viable (Grangier, 2011).

Hasta la fecha, se han detectado distintos genotipos de *M. plutonius* utilizando el método de secuenciación multi-locus (Hyanes y col., 2013; Budge y col., 2014), con variaciones en su patogenicidad dependiendo de su localización geográfica (Budge y col., 2014), a partir de la secuencia de nucleótidos del genoma bacteriano depositada en la Base de Datos de ADN de Japón (número de acceso AP012200 y AP012201) (Okomura y col., 2011). Hoy en día existe una PCR dúplex para diferenciar las cepas típicas y atípicas de *M. plutonius* (Arai y col., 2014).

4.1.8.5. Tratamiento y control de la loque europea

La sintomatología de la loque europea está estrechamente relacionada con la de la loque americana (De Graaf y col., 2013). Sin embargo, el agente etiológico, que en este caso es la bacteria *Melissococcus plutonius*, no forma esporas, por lo que la enfermedad se considera menos problemática que la loque americana y, por ello, las restricciones a la manipulación de la bacteria y el material infectado varían significativamente entre los países. En aquellos países donde la loque europea no está catalogada como enfermedad de declaración obligatoria todavía no es necesario adoptar medidas de precaución para reducir el riesgo de infección.

El clorhidrato de oxitetraciclina (OTC) es el antibiótico de elección para el tratamiento de la loque europea. Sin embargo, sólo se han publicado dos informes de la sensibilidad de *M. plutonius* a este antibiótico (Waite y col., 2003; Hornitzky y Smith, 1999) y ambos indicaron que todas las cepas probadas fueron sensibles a OTC. Sin embargo, ya se han detectado resistencias a este antibiótico en Estados Unidos (Miyagi y col., 2000), donde la OTC se empleaba como preventivo tanto para la loque europea como americana.

Una alternativa a la oxitetraciclina empleada en Gran Bretaña es el Método del Enjambre Agitado (*shook swarm method*), que consiste en agitar las abejas sobre un nuevo cuadro fundido y destruir el cuadro infectado; sin embargo, las colonias fuertemente infectadas mueren sin remedio (Wilkins y col., 2007). Además, la combinación de sacudir el enjambre más oxitetraciclina se aplica con el fin de conseguir un nivel más bajo de recurrencia de la loque europea (Waite y col., 2003).

Las bifidobacterias fueron aisladas desde el tracto intestinal de la abeja japonesa, *Apis cerana japonica*, e investigados para su aplicación potencial como un posible agente probiótico contra *Melissococcus plutonius* (Wu y col., 2013; 2014), al igual que algunos *Lactobacillus* del estómago de *Apis mellifera* (Killer y col., 2014) y otras bacterias del ácido láctico como *Lactobacillus kunkeei* (Endo y Salminen, 2013) con un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta bacteria.

Las medidas más eficaces empleadas para el control de la loque europea son medidas de desinfección o reemplazamiento de la reina con una población más resistente (Genersch, 2010).

Un estudio reciente ha demostrado que la diversidad floral que rodea a la colmena puede estar implicada en la salud de la colonia, según el tipo de miel que produzca, de una manera similar a la diversidad genética (Erler y col., 2014).

4.1.9. Virus que afectan a las abejas

Los virus fueron detectados por primera vez en las abejas en el año 1913, cuando White identificó un agente filtrable como la causa de la enfermedad de la cría ensacada (White, 1913). Numerosas investigaciones han determinado que las abejas son hospedadores de entre 16 a 24 virus, dependiendo si se clasifican como verdaderos virus (Ellis y Munn, 2005) o si se consideran las agrupaciones de especies estrechamente relacionadas como un único complejo. La mayoría de estos virus son virus ARN de cadena positiva y juegan un papel predominante en la patología de la abeja melífera. Atendiendo a la organización del genoma la mayoría de estos virus pertenecen al Orden Picornavirales el cual se compone de varias familias: la familia Dicistroviridae formada por los géneros Cripavirus (incluye al virus de las realeras negras) y Aparavirus (constituido por tres virus muy relacionados: parálisis aguda, Kashmir y parálisis aguda israelí); la familia Iflaviridae que solo tiene un único género (Iflavirus) al que pertenecen el virus de las alas deformadas, virus de *Varroa destructor* -1, el virus Kakugo, el virus de la parálisis lenta de abeja y el virus de la cría ensacada; mientras que el virus de la parálisis crónica de la abeja está incluido provisionalmente en la familia Nodaviridae ya que este virus no muestra características de similitud que permitan clasificarlo en una categoría taxonómica concreta (Ribière y col., 2010). Los demás virus ARN de las abejas aparecen como pequeñas partículas isométricas en el microscopio electrónico de transmisión, excepto el virus de la parálisis crónica que presenta partículas asimétricas. Por otro lado, existen una serie de virus que aún no han sido caracterizados molecularmente y son: el virus de la abeja X e Y, el virus de las alas nubladas, virus filamentoso, el virus iridiscente; el Virus Arkansas de la abeja y el virus Berkeley de la abeja.

Tabla 4.- Principales virus que afectan a las abejas

Nombre virus en español	Nombre virus en inglés	Siglas	Lesión	Patogenicidad (de 0 a 5)
Virus de las realeras negras	Black Queen Cell Virus	BQCV	Muerte reina	1
Virus de las alas deformadas	Deformed Wing Virus	DWV	Alas arrugadas	3
Virus Kakugo	Kakugo Virus	KV	Agresividad	1
Virus de <i>V. destructor</i> - 1	<i>Varroa destructor</i> Virus- 1	VDV-1	Infección asintomática	1
Virus del Lago Sinai	Lake Sinai Virus	LSV	Infección asintomática	1
Virus de la parálisis aguda	Acute Bee Paralysis Virus	ABPV	Parálisis y abejas brillantes	3
Virus Kashmir	Kashmir Bee Virus	KBV	Parálisis y abejas brillantes	4
Virus de la parálisis aguda israelí	Israeli Acute Paralysis Virus	IAPV	Parálisis y abejas brillantes	4

La propagación oral normalmente es ineficaz para la mayoría de los virus porque requiere grandes cantidades de inóculos (10^6 - 10^{11} partículas, dependiendo del virus) para establecer una infección (Bailey y Gibbs, 1964; Bailey y Ball, 1991). En cambio, la propagación por inyección en pupas o adultos es mucho más eficiente, puesto que se necesita una menor cantidad de virus para establecer una infección (10^2 - 10^4 partículas, dependiendo del virus).

Generalmente, los virus de las abejas se encuentran a bajos niveles de forma natural en las colonias de abejas como una infección inaparente, bajo ciertas condiciones pueden afectar seriamente la salud de la colonia e incluso conducirla al colapso (Chen y Siede, 2007). Algunos virus en niveles elevados pueden producir síntomas reconocibles o reducir la esperanza de vida de las abejas en diversos grados. Aunque el diagnóstico basado en estos síntomas es rápido y barato, presenta algunas desventajas: muchas infecciones de virus no muestran síntomas de manera constante, ni afectan a todas las etapas de vida, frecuentemente virus diferentes producen los mismos síntomas (ej. parálisis), un único virus puede presentar diferentes síntomas (ej. el virus de la parálisis crónica) y, por último, los síntomas pueden ser confundidos si coexisten varias infecciones.

La detección de infecciones virales en las abejas se basa cada vez más en la detección de ácidos nucleicos virales específicos. Puesto que la mayoría de los virus de las abejas tienen genomas de tipo ARN, el método más ampliamente utilizado es la transcriptasa inversa seguido de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Muchos protocolos de PCR cuantitativa se han descrito para analizar cada virus de forma independiente (Chantawannakul, 2006; Antúnez y col., 2012b; Runckel y col., 2011; De Miranda y col., 2013), mientras que otros autores utilizan técnicas de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) que consiste en una primera reacción de unión de sondas con la zona homóloga de interés y posteriormente solo las sondas hibridadas serán amplificadas por PCR, diferenciándose los distintos tamaños de cada sonda mediante un análisis de fragmentos. Esta técnica de amplificación permite la detección simultánea de 10 virus específicos de abejas (De Smet y col., 2012).

4.1.9.1. Complejo Virus de las Alas Deformadas/Virus Kakugo /Virus *Varroa destructor* -1 /Virus Egipcio de las abejas

Estos tres virus, además de pertenecer a la misma familia (Iflaviridae) presentan una gran semejanza entre sus secuencias, por lo cual están estrechamente emparentados. De hecho, DWV y VDV-1 muestran una similitud genética del 84% y una similitud de aminoácidos del 97% (Ongus, 2006). Del mismo modo, DWV y KV comparten un 97% del genoma y poseen una similitud poliproteínica del 98% (Fujiyuki y col., 2004; Ongus, 2006). A pesar de esta gran similitud genética, cada uno de estos virus produce una sintomatología diferente.

El virus de las alas deformadas (DWV) es el más importante y conocido de los tres. Fue aislado por primera vez en una muestra de abejas adultas de Japón (Bailey y Ball, 1991), y en la actualidad, se encuentra en Europa, América del Norte, América del Sur, África, Asia y el Oriente Medio (Allen y Ball, 1996; Antúnez y col., 2006; Ellis y Munn, 2005). Los síntomas más característicos del virus de las alas deformadas consisten en la eclosión de abejas jóvenes con alas arrugadas y/o deformadas (de ahí el nombre de la enfermedad) y el abdomen hinchado con una disminución del tamaño del cuerpo, que mueren poco después de su nacimiento (Dainat y col., 2012). Pero el virus de las alas deformadas también afecta a la respuesta sensorial, el aprendizaje y a la memoria en los adultos (Iqbal y Mueller, 2007), pudiendo llegar a producirse una decoloración en este tipo de individuos; aunque no suele desencadenar el colapso de colonias, sí aparece solo. Sin embargo, el mecanismo por el cual DWV causa las deformidades anatómicas de su hospedador no está claro (Chen y Siede, 2007). Las abejas sin signos clínicos también pueden estar muy infectadas, aunque contienen niveles más bajos de virus que las abejas con síntomas de enfermedad (Bowen-Walker y col., 1999; Lanzi y col., 2006; Tentcheva y col., 2006). Incluso este virus ha sido detectado en larvas y pupas aparentemente sanas (Chen y col., 2005a; 2005b; Yue y Genersch, 2005; Lanzi y col., 2006; Tentcheva y col., 2006; Fievet y col., 2006; Yue y col., 2006; De Miranda y Genersch, 2010). La incidencia del virus aumenta considerablemente desde el verano hasta el otoño en las pupas y en las abejas adultas (Tentcheva y col., 2004b). Varios estudios apoyan el hecho que DWV es el virus más prevalente en *Apis mellifera* (Berenyi y col., 2006; Nielsen y col., 2008; Baker y Shoroeder, 2008; Forgach y col., 2008; Teixeira y col., 2008). El ácaro *Varroa destructor* actúa como un vector activo del DWV (Dainat y col., 2012), puesto que el virus es capaz de replicarse en su interior, por lo que en este caso varroa no es sólo un vector mecánico (Martin y col., 1998; Bowen-Walker y col., 1999; Ongus, 2006). A pesar de esta evidencia, no ha sido posible encontrar el sitio de la replicación de DWV en el ácaro utilizando técnicas de immuno-localización (Santillán-Galicia y col., 2008). Algunos estudios han demostrado que presenta cierta relación sinérgica con *N. ceranae* (Martin y col., 2013; Doublet y col., 2015) y puede estar asociado a la pérdida de colonias (Dainat y col., 2013).

El virus 'Kakugo' (KV) tiende a producir cambios en el comportamiento. Para comprobarlo Fujiyuki presentó un avispon gigante (*Vespa mandarinia japonica*) a las abejas guardianas de una colonia infectada y, después, analizó la presencia o ausencia de ataque en dichas abejas; posteriormente encontró un virus en el cerebro de las abejas agresivas al que llamó Kakugo, que significa "listo para atacar" en japonés (Fujiyuki y col., 2004; 2006). KV y otras cepas de DWV (Terio y col., 2008) se han asociado con un aumento en la agresividad de las abejas, aunque algunas investigaciones han mostrado que las razas de abejas más agresivas no presentan niveles de infección con DWV más altos que las razas de abejas más tranquilas (Rortais y col., 2006). Dado que KV y DWV genéticamente son prácticamente indistinguibles, deberían realizarse más estudios para saber si se trata de dos variantes diferentes del mismo virus o si DWV podría producir cambios en el comportamiento como KV.

El virus *Varroa destructor*-1 (VDV-1) está genéticamente muy emparentado con DWV, pero es más específico de *Varroa destructor* que de las abejas (Ongus, 2006). VDV-1 y DWV parecen coexistir en las abejas y los ácaros formando parte del mismo complejo-especie (De Miranda y Genersch, 2010; Moore y col., 2011; Gauthier y col., 2011; Martin y col., 2012) debido a que ambos se replican tanto en los ácaros como en las abejas melíferas (Ongus y col., 2004; Yue y Genersch, 2005; Zioni y col., 2011) y se han encontrado recombinantes naturales entre ellos (Moore y col., 2011).). Ongus demostró que VDV-1 y DWV aparecían únicamente en abejas parasitadas por varroa (Ongus, 2006), apoyando su teoría en el hecho de que VDV-1 y DWV no estaban presentes en las zonas libres de varroa, como, por ejemplo, en Kenia y el norte de Suecia (Oldroyd, 1999; Yue y Genersch, 2005). Mientras que, otros estudios han detectado VDV-1 y DWV en las regiones donde *V. destructor* está ausente (Martin y col., 2012). También han sido detectados a altos niveles en diferentes tejidos de las abejas (Zioni y col., 2011; Gauthier y col., 2011). No se ha descrito una sintomatología para VDV-1, puesto que sus síntomas podrían quedar encubiertos por los síntomas de DWV o simplemente podría tratarse de una enfermedad subclínica de las abejas melíferas.

El virus egipcio de las abejas (VEB) está muy relacionado con DWV, pero todavía se desconocen los síntomas que provoca en las distintas etapas de vida de la abeja (Bailey y col., 1979).

4.1.9.2. Virus de las realeras negras (BQCV)

Las obreras adultas infectadas por el virus no suelen mostrar signos de enfermedad, tan solo afecta al desarrollo de las larvas y pupas de las reinas. El síntoma más característico producido por el virus de las realeras negras es la coloración ennegrecida de las paredes de la celda de las abejas reina después de haber sido operculada y que contienen una pro-pupa muerta en su interior (Bailey y Ball, 1991;

Leat y col., 2000). Las larvas enfermas son de un color amarillo pálido y su piel está endurecida en forma de saco, siendo este síntoma muy similar al inducido por el virus de la cría ensacada (SBV). Cuando las pupas infectadas adquieren un color oscuro o negro mueren en poco tiempo.

Estudios realizados por Tentcheva y col. (2004b) indicaron que la prevalencia de este virus es mayor en las abejas adultas que en las pupas y que su incidencia aumenta en primavera y verano. Parece ser que el virus de las realeras negras se transmite por medio de las secreciones glandulares de las abejas nodrizas. La confirmación de una asociación positiva entre *Nosema apis* y el virus de las realeras negras aún no ha sido demostrada (Chen y Siede, 2007).

La existencia de abejas infectadas con este virus ha sido confirmada en América del Norte, América Central, Europa, Asia, Oceanía, África y Oriente Medio (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005).

4.1.9.3. Complejo Virus de la Parálisis Aguda/Virus Kashmir / Virus de la Parálisis Aguda Israelí o complejo ABPV-KBV-IAPV

El Virus de la Parálisis Aguda de las abejas (ABPV), el Virus Kashmir (KBV) y el Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) están estrechamente relacionados (De Miranda y col., 2010) y además comparten muchas características como la organización genética y el comportamiento biológico, lo que justifica la agrupación de estas tres especies formando un complejo. Generalmente, los tres producen una infección asintomática, que puede ser letal, tanto a nivel individual como a nivel de la colonia (Allen y Ball, 1995; Todd y col., 2007). Son transmitidos mediante el ácaro *Varroa destructor* (Ball, 1989; Ball y Allen, 1988), el cual actúa como un vector activo de estos virus (Chen y col., 2004; Shen y col., 2005a; 2005b; DiPrisco y col., 2011), y como resultado de la canibalización de larvas enfermas por parte de las obreras.

Estos virus son capaces de infectar muy rápidamente, tanto a las pupas (después de la inyección; Bailey, 1967b; Bailey y Ball, 1991) como a las abejas adultas (tras la inyección o la alimentación: Maori y col., 2007a; 2009; Hunter y col., 2010), pudiendo matarlas a los 3 a 5 días después de la inoculación si la carga de viriones es suficiente. Esto influye negativamente sobre el desarrollo del ácaro, puesto que las pupas infectadas no llegan a completar su desarrollo impidiendo la liberación de los ácaros infecciosos desde las celdas de las pupas (Sumpter y Martin, 2004). Por tanto, la asociación de estos virus con varroa se manifiesta de manera inestable, dependiendo de la presencia de otros virus mejor adaptados a la transmisión por la varroa.

Cuando la carga viral es elevada pueden observarse síntomas clínicos, aunque son poco frecuentes, que se presentan en forma de temblores, parálisis progresiva, incapacidad para volar, abejas de color oscuro y sin pelo con aspecto brillante. En este

caso, y a diferencia del virus de la parálisis crónica (CBPV), esta parálisis normalmente permanece en el individuo y rara vez se extiende al resto de la colonia (De Miranda y col., 2010).

La gran variabilidad encontrada en el genoma de estos virus ha complicado el diagnóstico de la enfermedad y, por ello, su clasificación está basada en la detección de la secuencia viral específica mediante la utilización de métodos basados en PCR (De Miranda y col., 2010).

Los virus Kashmir, parálisis aguda y su variante israelí han sido detectados en todo el mundo, individualmente o asociados en parejas (De Miranda y col., 2010).

Se han encontrado datos sobre la presencia del virus de la parálisis aguda (ABPV) en *A. mellifera* en América del Norte, América Central y del Sur, Europa, Oceanía, Asia, África y el Medio Oriente (Ellis y Munn, 2005) y está considerado como el segundo virus de *Apis mellifera* más prevalente en Austria (Berenyi y col., 2006). La infección con ABPV rara vez causa signos clínicos (Bailey y col., 1981) y, por lo tanto, aparece frecuentemente en las abejas adultas aparentemente sanas, especialmente durante el verano. La diseminación de ABPV en las colonias probablemente ocurre a través de la secreción de las glándulas salivales de las abejas adultas infectadas (Chen y Siede, 2007). El ácaro *V. destructor* es capaz de estimular a este virus para replicarse y favorecer la inducción de la enfermedad durante la infección asintomática (Chen y Siede, 2007), induciendo una disminución en la defensa de las abejas e inyectando el virus directamente en la hemolinfa. Sin embargo, no es el único factor que contribuye a los brotes de infección del ABPV (Chen y Siede, 2007), ya que otros estudios demostraron la presencia de este virus en colonias de abejas que no estaban infectadas por *V. destructor* (Tentcheva y col., 2004b) y que la replicación de ABPV puede ser activada por situaciones estresantes para las abejas como, por ejemplo, la inyección del fosfato potásico (Hung y col., 1996).

Las cepas del virus kashmir (KBV) se han encontrado en *A. mellifera* de zonas como Canadá (Allen y Ball, 1995), Fiji (Anderson, 1991 citado por Todd y col., 2007), España (Allen y Ball, 1995), y los Estados Unidos (Bruce y col., 1995 citado por Chen y col., 2004; Hung y col., 1995 citado por Farncis y col., 2013b). La realización de pruebas de inmuno-difusión mostraron que las cepas de KBV de Canadá y España están serológicamente más emparentadas con ABPV que con otras cepas KBV (Allen y Ball, 1995). El análisis molecular reveló que KBV y ABPV comparten aproximadamente un 70% de homologías en su secuencia respecto al genoma completo, aunque existen diferencias significativas en varias áreas críticas del genoma entre los dos virus (De Miranda y col., 2010). KBV ataca a todas las fases del ciclo de vida de las abejas y permanece en su interior como una infección inaparente (Ball, 1985 citado por Benjeddou y col., 2001; Anderson y Gibbs, 1988). Este virus se considera como el más

virulento para la abeja melífera en condiciones de laboratorio, por su rápida multiplicación cuando es introducido por *V. destructor* en la hemolinfa (Chen y col., 2004), provocando la muerte de la abeja tan solo tres días después. Se ha demostrado que KBV no se transmite a través de los alimentos (Chen y Siede, 2007). En general, KBV aparece infectando a las abejas de forma menos frecuente que los otros virus (Tentcheva y col., 2004b).

El virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) se purificó en 2002, mientras que la propagación de una sola abeja en un grupo de abejas muertas que se encontraron enfrente de una colmena fue hallado en Israel (del que se deriva el nombre del virus) (Maori y col., 2007a; 2007b). Es el virus de la abeja de la miel más recientemente identificado dentro de este grupo y está muy relacionado genéticamente con el virus KBV (Maori y col., 2007a), hasta el punto en que puede ser considerado como una variante del virus KBV en vez de un virus distinto por sí mismo. Algunos autores (Cox-Foster y col., 2007) lo consideran como un indicador del síndrome de despoblamiento de las colmenas, ya que fue detectado en todas las colmenas afectadas por dicho síndrome, aunque también ha sido encontrado en colmenas sanas (Anderson y East, 2008).

4.1.9.4. Virus del Lago Sinai 1 y 2

Los virus del Lago Sinaí 1 (LSV-1) y 2 (LSV-2) son dos virus estrechamente emparentados que fueron identificados en colonias de abejas melíferas de EE.UU. (Runckel y col., 2011). La organización de las secuencias y su genoma los clasifican, junto con CBPV, en una familia única entre las familias Nodaviridae y Tombusviridae. Ambos virus son bastante frecuentes, aunque LSV-1 es más común que LSV-2, y está presente durante todo el año, siendo más prevalente cuando comienza el verano. Por el contrario, LSV-2 aumenta su incidencia a finales del invierno y reduce su abundancia el resto del año. LSV-1 y LSV-2 podrían estar relacionados con los virus Y e X de la abeja, respectivamente, ya que presentan fuertes similitudes en la cápside y el tamaño del genoma, incidencia estacional, infección basada en adultos y la ausencia de síntomas externos. Se ha demostrado que este virus, además de infectar a las abejas es capaz de infectar a otros polinizadores como por ejemplo la abeja solitaria *Osmia cornuta* (Ravoet y col., 2015b).

4.1.10. Aethinosis (agente *Aethina tumida*)

4.1.10.1. Etiología de la aethinosis

El “pequeño escarabajo de las colmenas”, *Aethina tumida*, fue descubierto por Murray en 1867 y pertenece a la familia Nitidulidae incluida en el orden Coleoptera. Es un parásito carroñero de las colonias de abejas melíferas y otras colonias de abejas sociales nativas de África subsahariana, su lugar de origen.

Las características principales, que permiten diferenciar un escarabajo adulto de la especie *A. tumida* de otras especies próximas, son la presencia de unas antenas en la cabeza con un extremo ensanchado en forma de maza y unos élitros cortos que muestran el final del abdomen. Al igual que la mayoría de Nitidúlidos, los adultos son aplanados dorsoventralmente. Además, esta especie en concreto, presenta todo el cuerpo cubierto de pelos cortos y alcanzan un tamaño corporal en estado adulto de 5,7 x 3,2 mm, siendo las hembras ligeramente más alargadas que los machos.

Este escarabajo realiza una metamorfosis completa compuesta por cuatro fases de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. El proceso completo requiere entre 3 y 12 semanas, dependiendo de la humedad, la temperatura y la disponibilidad de alimento.

Los escarabajos adultos pueden sobrevivir hasta 6 meses, durante ese tiempo se aparean dentro de la colmena y las hembras pueden llegar a poner entre 1.000 y 2.000 huevos a lo largo de su vida.

Los huevos del pequeño escarabajo de las colmenas son de color blanco y su tamaño equivale a 2/3 de un huevo de abeja melífera. La hembra al desovar coloca los huevos en grupos de 10 a 30 formando unos racimos muy característicos (Lundie, 1940 citado por Neumann y col., 2013) en las pequeñas grietas de la colmena o dentro de las celdas operculadas. El éxito de la eclosión de los huevos depende del grado de humedad relativa, la cual no debe ser inferior al 50% para un correcto desarrollo (Somerville, 2003 citado por Neumann y col., 2013; Stedman, 2006 citado por Arbogast y col., 2012).

Las larvas son de un color crema y emergen de los huevos tras 1 a 6 días, aunque la mayoría eclosionan en un plazo máximo de 3 días, a través de ranuras longitudinales realizadas en el extremo anterior del huevo. Estas larvas son muy similares morfológicamente a las de la polilla de la cera (*Galleria mellonella*), ya que poseen tres pares de patas cerca de la cabeza pero la presencia de espículas dorsales es característica de *A. tumida*. Miden aproximadamente un centímetro, aunque su longitud es variable según la calidad de los recursos alimenticios disponibles en el medio (Stedman, 2006 citado por Arbogast y col., 2012). Se alimentan de polen, miel y crías de abeja, igual que los individuos adultos. El período larval dura entre 8 y 29 días dependiendo de la disponibilidad de alimento y la temperatura en el interior de la colmena. A continuación, las larvas alcanzan la fase errante y abandonan la colonia en busca de un sustrato adecuado para pupar en las proximidades de la colonia.

Una vez en el suelo, las larvas excavan pequeñas cámaras de 1 a 20 cm de profundidad en el suelo y se convierten en pupas, siendo este estadio el más vulnerable a las condiciones meteorológicas adversas. La pupa permanecerá enterrada entre 15 y 60 días para completar su desarrollo en función de la temperatura y la

humedad del suelo, pasando de un color blanquecino a marrón oscuro hasta convertirse en adultos.

Al entrar en la fase adulta, abandonan el suelo y son capaces de volar varios kilómetros en busca de nuevas colonias hospedadoras atraídos por los olores de colonias de abejas de miel, completándose de esta forma el ciclo biológico del pequeño escarabajo de la colmena. Al principio, los adultos presentan una coloración desde el rojizo al marrón que se va oscureciendo hasta negro según van madurando. Los adultos inmaduros pueden confundirse con otros escarabajos nitidúlidos, como, por ejemplo, *Cychramus luteus* que presenta una tonalidad rojiza del cuerpo y también puede asociarse a las colonias de abejas (Neumann y Ritter, 2004; Ellis y col., 2008).

4.1.10.2. Epidemiología de la aethinosis

El pequeño escarabajo de la colmena, *A. tumida*, ofrece un verdadero riesgo potencial para las abejas melíferas en todo el mundo (Cuthbertson y col., 2010) porque puede diseminarse mediante el vuelo activo, el desplazamiento de colonias de abejas melíferas infestadas, o el transporte de productos de panales infestados. Además, la biología de la especie le permite soportar una amplia gama de condiciones climáticas e incluso es capaz de resistir varios días sin alimentarse. Asimismo, el escarabajo tiene una tasa muy alta de reproducción provocando un rápido aumento de sus poblaciones bajo condiciones favorables.

El alcance de los daños causados por estos escarabajos depende en gran medida de las condiciones climáticas. Los pequeños escarabajos de la colmena tienden a ser más problemáticos en zonas con temperaturas cálidas y alta humedades.

Como se comentó anteriormente, *A. tumida* procede de África subsahariana y en esta región se le considera una plaga menor ya que esta especie rara vez causa daños severos en las colonias fuertes, dado que las abejas africanas han desarrollado estrategias para combatirlos (Hepburn y Radloff, 1998; Neumann y Elzen, 2004; Neumann y Ellis, 2008). Sin embargo, estos escarabajos pueden afectar gravemente a las subespecies de abejas europeas (Elzen y col., 1999; Hood, 2004 citado por OIE, 2013b) y a otros insectos que no pertenecen al género *Apis*, como los abejorros y las abejas sin aguijón llamadas meliponas (Spiewok y Neumann, 2006; Hoffmann y col., 2008; Greco y col., 2010; Halcroft y col., 2011).

En la actualidad se han encontrado evidencias de su presencia en los Estados Unidos de América (1996), en Egipto (2000), en Australia (2002) y en Italia (Neumann y Ellis, 2008; Mutinelli y col., 2014). Se produjeron introducciones en distintas regiones de Canadá desde el año 2002 hasta 2012. En más de una década, *A. tumida* se ha extendido prácticamente por todos los EE.UU. y en toda la costa este de Australia y su

propagación a estos nuevos territorios ha sido facilitada por el manejo y las poblaciones de abejas silvestres.

El pequeño escarabajo de las colmenas, es un claro ejemplo de un parásito que ha sido trasladado a otros lugares por el comercio mundial de la miel y otros productos de la colmena, ya que este pequeño escarabajo, al abrir una colmena, huye de la luz y tiende a esconderse entre los restos del fondo de la colmena o en pequeñas grietas entre los equipos de apicultura. Este comportamiento fotofóbico facilita la expansión de *A. tumida* hacia nuevas zonas por medio del comercio internacional de productos apícolas. Para evitar la diseminación de *A. tumida* a través del comercio apícola, la Unión Europea estableció el Reglamento de la Comisión (UE) n. 206/2010 que regula la importación de abejas melíferas.

La primera denuncia en Europa fue en el año 2004 cuando se descubrieron larvas y huevos de *A. tumida* en unas jaulas de reinas de *A. mellifera* importadas ilegalmente desde Texas a Portugal (Neumann y Ellis, 2008). Tras este hallazgo, las colmenas en las que se introdujeron estas reinas fueron destruidas inmediatamente. Recientemente los Servicios Veterinarios Oficiales italianos han comunicado a la Comisión Europea la detección de un foco de *A. tumida* en la región de Calabria (Mutinelli y col., 2014), al sur del país. España sigue siendo un país libre de *A. tumida* (Cepero y col., 2014b) y está capacitado para detectar su presencia de una forma rápida y eficaz en el caso de que pudiera llegar a nuestro país.

La aethinosis es una enfermedad de declaración obligatoria dentro de la Unión Europea (Anexo I del RD 526/2014) y también está recogida en las listas de la OIE (2015). Su aparición o sospecha deben ser comunicadas inmediatamente a las autoridades competentes, ya que una pronta detección es clave a la hora de evitar el desarrollo de una plaga en aquellas áreas libres del escarabajo de las colmenas.

4.1.10.3. Patología de la aethinosis

El primer signo de la infestación por el pequeño escarabajo de las colmenas es la presencia de escarabajos adultos. Durante las inspecciones, los escarabajos adultos huyen de la luz, se esconden, y se pueden ver corriendo para ponerse a cubierto en las esquinas o, de forma similar, sobre los panales. Es difícil encontrar huevos de escarabajo en una colonia, sobre todo cuando los niveles de infestación son bajos. Las infestaciones larvarias se asocian con un olor a podrido debido a la muerte de la cría de las abejas melíferas y/o a la fermentación de la miel almacenada. Antes de la pupación, las larvas al deambular suelen dejar rastros de una sustancia viscosa (o “limo”) dentro y fuera de la colonia, que se puede observar a simple vista como un signo de infestación. Pueden encontrarse pupas del pequeño escarabajo de las colmenas tamizando el suelo alrededor de la colonia y buscando las cámaras de pupación.

Tanto los adultos como las larvas del pequeño escarabajo de las colmenas se alimentan de las crías de las abejas melíferas, de la miel y el polen, causando así la muerte de las crías, la fermentación de la miel y la destrucción de los panales; además, de que también constituye un serio problema para las salas de extracción de miel donde los panales, la miel y los opérculos de cera guardados se convierten en posibles lugares de alimentación y de cría. Los escarabajos pueden incluso provocar el abandono de la colmena por las abejas y hacer que las abejas melíferas adultas se dispersen, hecho asociado a la fermentación de la miel almacenada producido por la conducta alimentaria de las larvas del escarabajo. Todo ello causa un grave deterioro a los panales y, a menudo, desemboca en el colapso total de la colonia y conlleva enormes pérdidas económicas.

Por el momento, se desconocen las razones del diferente impacto que produce este parásito en las colonias de abejas africanas y europeas. Entre las razones más posibles cabe destacar las diferencias de comportamiento entre las subespecies de la abeja melífera africana y europea, las diferencias climáticas y el comercio de colonias de abejas a nivel internacional, así como la utilización de diferentes técnicas de apicultura en cada región.

4.1.10.4. Diagnóstico de la aethinosis

El primer diagnóstico consiste en la observación macroscópica del agente causal de la aethinosis. Para la detección de los individuos adultos es muy corriente el uso de herramientas de captura muy variadas, que van desde aparatos aspiradores y succionadores hasta trampas comerciales de todo tipo mediante el empleo de diversos atrayentes como, por ejemplo, vinagre de sidra de manzana, polen, papillas preparadas con la levadura *Kodamaea ohmeri* (Arbogast y col., 2007; Torto y col., 2010.), luz o feromonas. Es importante añadir aceite mineral o vegetal a las trampas, como agente para matar los escarabajos y poder identificarlos posteriormente atendiendo a sus caracteres morfológicos.

Las trampas (*Beetle Blaster®*, *Vita diagnostic*) utilizadas se suelen colocar en el fondo de la colmena, aunque también pueden situarse entre los cuadros de la colmena y en sus alrededores para capturar las larvas errantes. La eficacia de estas trampas puede maximizarse si se localizan en zonas con sombra y tan cerca como sea posible de las colmenas. El trampeo de los escarabajos puede emplearse en las colonias para realizar un seguimiento periódico de la presencia de escarabajos adultos. Además de las trampas, existe un tipo de planchas con agujeros que permiten esconderse a los escarabajos pero impiden la entrada de las abejas, se colocan en el fondo de la colmena y pasados menos de tres días se retiran y se examinan para contar los escarabajos capturados. Estas planchas pueden servir para predecir las tasas de infestación por escarabajos adultos en zonas que no hayan sido colonizadas por este insecto (Schäfer y col., 2008).

Para asegurar la identificación de *A. tumida* y evitar posibles confusiones con las larvas de polilla u otros escarabajos similares, se recomienda la utilización de la técnica de PCR cuantitativa desarrollada por el equipo de Ward y col. (2007).

4.1.10.5. Tratamiento y control de la aethinosis

Numerosos autores han investigado diversos métodos para el control de todas las etapas de vida de *A. tumida*, que van desde la prevención de la infestación hasta su tratamiento. Estos métodos preventivos incluyen el mantenimiento de colonias fuertes, impulsar el comportamiento higiénico natural en las colonias de abejas melíferas y el estrechamiento de la entrada de la colmena para impedir el acceso del escarabajo.

Se han utilizado diferentes sustancias para el control químico de esta plaga en la colmena, frente a las cuales, tanto los adultos como las larvas, presentan distinta susceptibilidad. También se han empleado diversas sustancias para el tratamiento del suelo alrededor de las colmenas con el fin de erradicar las larvas cuando entran en el suelo para pupar. Sin embargo, muchas de estas sustancias son muy tóxicas para otras especies de insectos, así como para las abejas, y pueden conducir al desarrollo de poblaciones resistentes de escarabajos (De Guzmán y col., 2011). Tras varios ensayos con distintas sustancias, el CheckMite+® (Elzen y col., 1999) ha sido considerado el mejor tratamiento para controlar las poblaciones de escarabajo en las colmenas, contiene como principio activo cumafós que también se utiliza para controlar el ácaro parásito *Varroa destructor*.

El control biológico, usando hongos entomopatógenos, tiene el potencial suficiente para actuar como una alternativa a los insecticidas químicos, ya que son a menudo altamente específicos de un único hospedador y no son tóxicos para los vertebrados (Lacey y col., 2001). Un estudio realizado por Leemon y McMahon (2009 citado por Annand, 2011) demostraron que varias cepas de hongos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* tenían buena eficacia contra larvas y adultos de *A. tumida* en ensayos de laboratorio. Sin embargo, debido a los hábitos alimenticios (carroñero en panales viejos y mohosos) del escarabajo, existe la posibilidad que *A. tumida* desarrolle tolerancias a una gran variedad de patógenos microbianos que se producen de forma natural en su entorno y no permita obtener los resultados esperados al aplicar estos hongos en el campo.

Los nemátodos entomopatógenos se han utilizado con éxito en programas de control para varias especies de insectos incluyendo escarabajos. Trabajos recientes han demostrado que los nemátodos entomopatógenos de las especies *Steinernema riobrave*, *S. carpocapsae*, *S. kraussei* y *Heterorhabditis indica* tienen el potencial para controlar las fases larvianas de *A. tumida* después de una sola aplicación sobre el suelo (Ellis y col., 2010; Cuthbertson y col., 2012).

Otros agentes biológicos adicionales pueden jugar un papel importante en el control de *A. tumida* en algunas áreas o situaciones. Por ejemplo, las hormigas de las especies *Solenopsis invicta* y *Pheidole megacephala* que actúan como depredadores alimentándose de larvas del pequeño escarabajo de las colmenas (Torto y col., 2010).

4.2. Agentes nosógenos abióticos: Plaguicidas

Las abejas melíferas desempeñan un importante papel ecológico y económico como polinizadores de una gran variedad de cultivos y plantas silvestres (VanEngelsdorp y Meixner, 2010). No obstante, al estar en contacto con el medio ambiente, son susceptibles a una amplio número de amenazas medioambientales, algunas de las cuales se han incrementado durante los últimos 5 a 10 años (Genersh y col., 2010). Otra de estas causas, es el efecto potencialmente nocivo que algunos tratamientos agrícolas pueden ejercer sobre este grupo de beneficiosos insectos (FAO, 2008) y por ello, a lo largo de los últimos años muchas investigaciones se han centrado en el estudio de la contaminación de los productos apícolas con plaguicidas (Bogdanov y col., 1998; Jiménez y col., 2005). La procedencia de este tipo de contaminantes puede ser agrícola y/o ganadero.

El término plaguicida se define como cualquier sustancia que se destina a prevenir, controlar, ahuyentar, atraer o destruir a una plaga. Por consiguiente, una plaga puede tratarse de cualquier organismo vivo (incluyendo microorganismos, plantas o animales) dañino que provoque pérdidas económicas o propague alguna enfermedad.

A su vez los plaguicidas pueden ser naturales (como por ejemplo la bacteria *Bacillus thuringiensis*) o sintéticos (compuestos químicos), y según su acción específica se dividen en: biocidas (destruyen microorganismos), alguicidas (controlan el crecimiento de algas), fungicidas (destruyen hongos), herbicidas (erradican plantas no deseadas), insecticidas (matan insectos), acaricidas (eliminan a los ácaros que se nutren de animales o plantas), nematocidas (matan nematodos) y rodenticidas (controlan roedores). Puesto que cualquier sustancia puede provocar daños si no se usa correctamente, el empleo de los plaguicidas está regulado por la Comisión europea (Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011, sustituido recientemente por el Reglamento de Ejecución (UE) nº 485/2013 y 781/2013) y el Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente.

En la última década, los apicultores de varios países europeos y americanos (Gross, 2008 citado por Bernal y col., 2010; VanEngelsdorp y col., 2008) incluido España (Higes y col., 2009a), han denunciado un incremento en la pérdida de colonias de abejas alcanzando valores del 80 % en algunas zonas (Johnson, 2010; Dainat y col., 2012; y datos sin publicar del CAR). Varios investigadores sospechan que se trata de un problema multifactorial, en el cual factores externos como los pesticidas pueden llegar

a confundir a las abejas, impidiéndoles encontrar el camino de regreso a la colmena o provocándoles directamente la muerte (El Hassani y col., 2005; Rortais y col., 2005). De este modo, han surgido varias líneas de investigación dedicadas a medir el contenido de los residuos (Chauzat y col., 2009; Mullin y col., 2010), para buscar compuestos específicos principalmente relacionados con la inducción de posibles efectos subletales de algunos pesticidas sobre las abejas (Halm y col., 2006; Nguyen y col., 2009).

La mayor parte de los tratamientos empleados para el control de varroa dejan residuos en la colmena, con el problema añadido de que en algunas ocasiones los tratamientos no se realizan correctamente, ya que se aplican dosis excesivas del compuesto o incluso sustancias no registradas cuyos efectos sobre las abejas (subletales o a largo plazo) están por determinar (Mullin y col., 2010).

Las abejas pueden introducir insecticidas sistémicos a la colmena mediante el transporte de polen y néctar contaminados e intoxicar al conjunto de la colonia en aquellas zonas de cultivos tratados con este tipo de insecticidas (Bos y Masson, 1983; Villa y col., 2000). La mayor parte de los pesticidas que se aplican sobre la superficie de la planta son de acción rápida y sus residuos pueden perdurar desde unas pocas horas hasta varios días, mientras que los insecticidas de tipo sistémico se introducen en el interior de las plantas melíferas y poliníferas (Rortais y col., 2005). Las abejas obreras que salen a pecorear pueden intoxicarse mediante el contacto con plantas tratadas (Koch y Weißer, 1997; Thompson, 2010) o a través de la absorción de partículas de polvo contaminado durante el vuelo (Prier y col., 2001). El riesgo de la transferencia de algunos químicos se eleva con los insecticidas sistémicos (Waller y col., 1984).

El análisis de las abejas y otros productos apícolas como la miel, la cera y el polen es utilizado por los investigadores como una herramienta para evaluar los niveles de contaminación ambiental, tanto en áreas industriales como agrícolas (Wallner, 1999; Chauzat y col., 2006). De hecho, el polen es uno de los productos apícolas más empleado para controlar la presencia de plaguicidas relacionados con la mortalidad de las abejas (Waller y col., 1984; Kubik y col., 1999). Aunque también se han realizado varios estudios en los que se han monitorizado residuos de acaricidas en muestras de cera de abejas, como por ejemplo el bromopropilato (Hansen y Petersen, 1988;), el cumafós (Tremolada y col., 2004; Berry y col., 2013), el amitraz (Lodesani y col., 1992), el fluvalinato (Lodesani y col., 1992; Tsigouri y col., 2004; Berry y col., 2013) y el tetradifón, un compuesto normalmente usado en los países asiáticos.

No obstante, entre los insecticidas más importantes destacan la imidacloprida (Gaucho®) y el fipronil (Regent®), que en la última década, se han relacionado estrechamente con la pérdida de colonias (Suchail y col., 2000; Pisa y col., 2015).

El fipronil es un fenilpirazol que actúa como insecticida sistémico de segunda generación (Simon-Delso y col., 2014) y se utiliza frecuentemente en medicina veterinaria porque inhibe la transmisión del impulso nervioso estimulando la acción del ácido gamma aminobutírico, el cual se fija sobre los receptores impidiendo el impulso nervioso (Cole y col., 1993). En las abejas provoca hiperexcitación, convulsiones, temblores y parálisis (Zaluski y col., 2015) que terminan causando la muerte del individuo. Tiene excelente actividad terapéutica contra pulgas y garrapatas cuando se administra de forma tópica en los animales domésticos (Hainzl y Casida, 1996; Le Faouder y col., 2007). Se usa también como plaguicida, ya que es muy efectivo a bajas dosis contra numerosos insectos terrestres que dañan los cultivos (Balança y De Visscher, 1997), y para el control de muchos suelos e insectos foliares en diversos tipos de cultivos.

Sin embargo, el impacto de este compuesto (y sus metabolitos) sobre las abejas varía, dependiendo de la concentración a la que son sometidas, ya que afecta a distintos receptores con diferente afinidad por cada uno de ellos. La concentración más baja de fipronil podría bloquear un primer receptor, desencadenando determinados efectos en el comportamiento (como por ejemplo, extensión de la proboscide como respuesta a la sacarosa), y una concentración más alta bloquearía otros receptores que a su vez antagonizarían los efectos del primero. Alternativamente, este efecto no lineal también se desencadena por diferentes metabolitos del fipronil.

En España, el fipronil estaba registrado como producto fitosanitario desde 2002 hasta que la Unión Europea prohibió su uso para el tratamiento de semillas de maíz y girasol a finales del año 2013 (Reglamento de ejecución (UE) Nº 781/2013 de 14 de agosto de 2013), por el riesgo que presentaba para la salud de las abejas según declaró la Agencia Europea para la Salud Alimentaria (*EFSA*, siglas en inglés). No obstante, el estudio de esta sustancia en muestras de polen almacenado (Garrido-Bailón y col., 2010) y aplicada para el tratamiento de semillas de girasol (Bernal y col., 2011) demostró que no existe una relación entre la pérdida de colonias y el empleo de este compuesto en nuestro país.

Por otra parte, en el registro de productos fitosanitarios del MAGRAMA, además de Gaucho®, figuran desde 1993 otros compuestos cuyo principio activo es la imidacloprida, con concentraciones que oscilan entre el 0,015 y el 70%. La imidacloprida es un insecticida incluido en la familia de los neonicotinoides, es altamente tóxico para la abejas y produce un pico de mortalidad inesperado a muy bajas dosis, que puede explicarse por la alta toxicidad de sus metabolitos (Suchail y col., 2001). Además, varios estudios han revelado una serie de alteraciones en el comportamiento de abejas expuestas a diferentes concentraciones de imidacloprida como cambios en el comportamiento pecoreador y recolector de alimentos (Colin y

col., 2001), pérdida de la capacidad para comunicar la localización de las fuentes de alimentos (Kirchner, 1999) y capacidad de aprendizaje (Decourtye y col., 2003). Asimismo, las abejas son más susceptibles a la acción tóxica de la imidacloprida y sus metabolitos durante los meses de verano, cuando podrían presentarse signos clínicos de intoxicación (Suchail y col., 2004) que afectan principalmente al sistema nervioso y pueden llegar a provocar la muerte de las abejas.

Recientemente, la UE (Reglamento de ejecución Nº 485/2013) prohibió durante dos años el uso de tres neonicotinoides, entre los cuales se encuentra la imidacloprida junto con la clotianidina y el tiametoxan, debido a los efectos subletales que producen en las abejas. Los neonicotinoides son unos insecticidas de nueva generación derivados de la nicotina que pueden afectar al sistema nervioso de los insectos causándoles parálisis y hasta la muerte, pero no suponen un riesgo para la salud humana. Schneider y col. (2012) demostró que pueden causar cambios en el comportamiento, reducción de la actividad de pecoreo, y aumento de las distancias de vuelo durante la búsqueda de alimento. También se conoce la existencia de interacciones entre el microsporidio *Nosema* y los neonicotinoides (Pettis y col., 2012), aunque no todos los investigadores apoyan esta hipótesis (Alaux y col., 2010). Es posible que los neonicotinoides por si solos no constituyan la causa principal del síndrome de despoblamiento (Thompson, 2012), sin embargo pueden ser un factor que contribuye en la pérdida de colonias de abejas.

A continuación se enumeran los productos de síntesis más empleados en apicultura para el control de la varroosis.

El fluvalinato se trata de un piretroide sintético con actividad insecticida y acaricida que actúa por contacto e ingestión. No posee actividad sistémica y su acción por vapor es casi despreciable. Actúa primariamente como veneno de contacto que interfiere con los sistemas nervioso central y periférico de los insectos en una forma similar a la de los piretroides fotoestables. Es muy activo a altas temperaturas. Persiste durante 2 a 4 semanas y sus residuos no son absorbidos por las raíces de las plantas. Es eficaz tanto en otoño como en periodos más cálidos. Además puede ser empleado durante la floración, sin perjuicio para las abejas. Existen distintas formulaciones (por ejemplo el Apistan®), en forma de tiras impregnadas, que se utilizan en apicultura para el control de la varroosis de las abejas.

La flumetrina es otro piretroide sintético que actúa a nivel pre y post sináptico induciendo potenciales de acción repetitivos y alterando los impulsos nerviosos axonales debido a cambios en la permeabilidad K^+/Na^+ . Su eficacia es mayor cuando se utiliza al final del verano, después de la cosecha de la miel. Se vende bajo el nombre comercial de Bayvarol® en forma de tiras para el control de la varroosis.

El cumafós es un plaguicida que pertenece a la familia de los organofosforados y presenta actividad insecticida y acaricida. Se vende bajo el nombre comercial de CheckMite+® en forma de tiras para el control del ácaro *V. destructor* en las colonias de abejas. Su uso no está recomendado cuando se realiza cría de reinas.

Y por último, el amitraz se trata de un derivado nitrogenado con actividad acaricida e insecticida. El mecanismo de acción del amitraz es de tipo neurotóxico. Actúa fundamentalmente como inhibidor de los receptores octopaminérgicos, conduciendo a una inhibición neurofisiológica. Como consecuencia aparece una parálisis del parásito, que permite su eliminación natural por caída. Su nombre comercial es Apivar®, se comercializa en forma de tiras que impregnan la cutícula externa del ácaro y actúa por contacto.

MATERIAL Y MÉTODOS



5. VIGILANCIA ACTIVA: muestreos sistemáticos

La vigilancia activa consistió en la realización de dos muestreos sistemáticos de tipo transversal en las explotaciones apícolas de España durante los años 2010 y 2011. Este tipo de estudio permite estimar la magnitud y distribución de una enfermedad en un momento dado. El carácter transversal proviene de la medición de una variable dependiente, la detección de agentes nosógenos en este caso, durante un tiempo determinado. Por lo tanto, estos estudios son de máxima utilidad para determinar la prevalencia de un daño y, por ello, permiten la determinación de posibles factores de riesgo en la población de estudio.

5.1. Diseño de la vigilancia activa

5.1.1. Cálculo muestral

El número de colmenares a muestrear, necesarios para detectar agentes nosógenos de forma significativa por Comunidad Autónoma, se calculó en base al 40% de prevalencia estimada para el ácaro *Varroa destructor* en la primavera de 2007 (dato establecido en un trabajo previo por Garrido-Bailón, 2012) y en función al censo de apicultores y su distribución por Comunidad Autónoma en el año 2007 (MAGRAMA 2007). Se establecieron los parámetros en un 10% de error y un 95% de índice de confianza. El muestreo se diseñó con el objeto de contrastar una posible prevalencia del 40% por lo que la inferencia poblacional es relevante.

El estudio se diseñó para hacer dos muestreos (2010 y 2011) en primavera, ya que en esta época del año es cuando se observa una mayor presencia de los patógenos.

Se estableció como unidad epidemiológica la recolección de seis muestras procedentes de seis colmenas elegidas al azar dentro de un mismo colmenar.

5.1.2. Tipo de muestra y material para su recogida

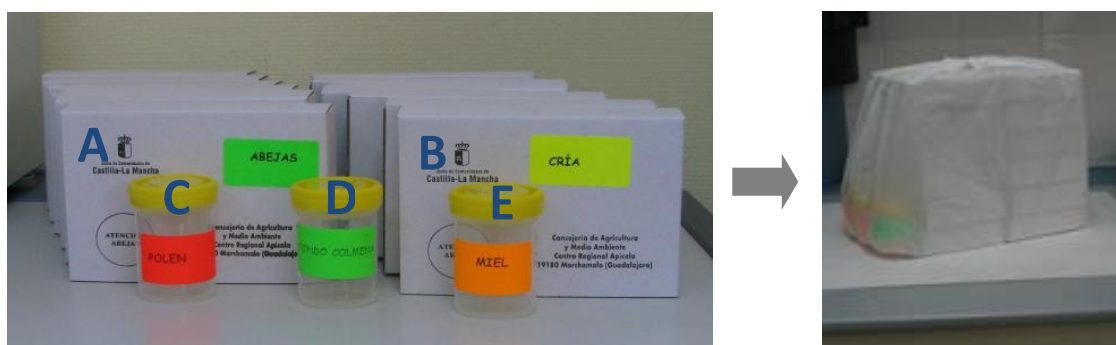
El estudio se dio a conocer en varias jornadas y congresos, tanto nacionales como internacionales, para fomentar el nivel de participación de los apicultores ya que se solicitaba su colaboración de forma voluntaria.

Además de la difusión en estos eventos, se estableció contacto de forma telefónica con las asociaciones de apicultores y organismos sanitarios (oficiales y no oficiales, como por ejemplo en las Oficinas Comarcales Agrarias –OCAs- y en las Asociaciones de Defensa Sanitarias –ADS-) de todas las Comunidades Autónomas.

Para facilitar la recogida de muestras cada apicultor participante recibió un paquete con el siguiente contenido:

- Seis cajas de cartón identificadas con una pegatina verde para la recogida de unas cien ABEJAS por colmena, con un tamaño de 12,5 x 18,0 x 4,5 cm.
- Otras seis cajas de cartón con el nombre de “CRÍA” en una pegatina amarilla para introducir una porción de cuadro de cría por colmena.
- Un bote de plástico identificado con el nombre “FONDO COLMENA” en una pegatina verde, para introducir una pequeña cantidad de los restos de cada una de las seis colmenas muestreadas.
- Un bote de plástico con capacidad de 100 ml y marcado con una pegatina de color naranja para introducir una pequeña cantidad de MIEL de una de las colmenas muestreadas.
- Un bote de plástico con una pegatina roja para introducir una pequeña porción de cuadro con POLEN de reserva de una colmena.
- Una ENCUESTA para la recogida de datos de interés sanitario y con las instrucciones para realizar de manera correcta la recogida de cada tipo de muestra.

Figura 4.- Material enviado a los apicultores para la recogida de muestras: cajas de cartón para las muestras de abejas (A) y cría de abejas (B), botes para la recolección de polen (C), restos del fondo de la colmena (D) y miel (E).



El tipo de material enviado, tanto las cajas de cartón como los botes de plástico, fue elegido para garantizar la conservación de cada tipo de muestras desde su recogida en el colmenar hasta su recepción en nuestro laboratorio. Así, el cartón fue seleccionado para el transporte de las abejas porque les permitía respirar y mantenerse vivas hasta su recepción en el laboratorio. Los botes herméticos evitaban que la miel fuera derramada dentro del paquete. Todo ello iba incluido en una bolsa de plástico como se muestra en la imagen anterior y que facilitaba el manejo para el apicultor.

5.1.3. Toma de muestras

El reparto del material a cada apicultor se organizó a través de los responsables de las diferentes asociaciones de apicultores y de los veterinarios comarcales. Se dio las instrucciones para que cada apicultor recogiera muestras de abejas, cría y fondo de

colmena de seis colmenas elegidas al azar dentro de un mismo colmenar, además de muestras de miel y polen de una de esas seis colmenas.

Una vez finalizado el muestreo, la recolección de las muestras fue organizada por los veterinarios responsables de las asociaciones para remitir las muestras al laboratorio de patología del CAR en condiciones de frío a través de un servicio de mensajería cuyos costes fueron asumidos por el estudio.

5.1.4. Recepción y registro de las muestras

Una vez que las muestras eran recibidas en el laboratorio eran identificadas mediante un código alfanumérico y se anotaban por orden de llegada en un libro de registro junto con las posibles incidencias que pudieran surgir. Todas las muestras procedentes de un mismo colmenar recibieron el mismo número de registro, aunque se dividieron en diferentes submuestras (abejas adultas, cría de abejas, polen, miel y fondo de colmena) y, a continuación, fueron almacenadas a -20 °C para garantizar un correcto estado de conservación hasta su procesado y facilitar su manipulación.

5.1.5. Clasificación bioclimática de las muestras

Se eligió la clasificación de Rivas-Martínez (1987) para clasificar las muestras en varios pisos climáticos según su localización gracias a las coordenadas GPS aportadas por los propietarios de las explotaciones apícolas. En este caso, al realizar los mapas de distribución de los distintos patógenos nos centraremos en el estudio de cinco pisos bioclimáticos, que son: colino, montano, supramediterráneo, mesomediterráneo y termomediterráneo (Tabla 1). El piso subalpino se descartó para el análisis bioclimático por el escaso número de muestras obtenido a lo largo de todo el estudio. Por otro lado, se agruparon los datos de ambos años de estudio en una tabla para calcular la prevalencia media en cada piso y se utilizó el test Chi-cuadrado para analizar estadísticamente las posibles relaciones existentes entre los distintos pisos estudiados.

5.2. Encuesta epidemiológica

La encuesta epidemiológica (anexos I y II) que se incluyó en los paquetes enviados a los apicultores sirvió para la recogida de datos a cerca del estado sanitario de las explotaciones apícolas (Tabla 5). Dicha encuesta estaba dividida en varios apartados que el apicultor debía rellenar para recopilar información sobre el colmenar del que procedían las muestras.

Tabla 5.- variables incluidas en cada apartado de la encuesta epidemiológica

Datos del propietario y su explotación (n=9)
Apicultor, Asociación a la que pertenece, localización, coordenadas geográficas, número total de colmenas, número de asentamientos, número de colmenas del apiario muestreado, tipo de colmena, actividad trashumante
Información sobre pérdida de colmenas (n=7)
Número colmenas productivas en octubre, número de colmenas productivas en abril, número de colonias compradas o divididas entre octubre y abril, número de colonias vendidas o eliminadas entre octubre y abril, número de colmenas muertas sin abejas en ese período, cantidad de colonias unidas, cantidad de colonias perdidas
Información sobre tratamientos aplicados a las colmenas (n=6)
Número de tratamientos al año frente a varroa, productos utilizados, fecha de aplicación, duración de los tratamientos (semanas), dosis empleadas, otros tratamientos aplicados
Patógenos testados (n=14)
<i>V. destructor</i> , <i>A. woodi</i> , <i>N. apis</i> , <i>N. cerane</i> , tripanosomátidos, neogregarinos, <i>A. tumida</i> , <i>A. apis</i> , <i>M. plutonius</i> , <i>P. larvae</i> , DWV, BQCV, LSV, Complejo ABPV-KBV-IAPV
Plaguicidas testados (n=60)
4-4'-DDE, 4-4'-DDT, 4-4'-TDE, Acrinatrina, Alacloro, Aldrin, Atrazina, b-HCH, Bromopropilato, Carbofurano, Carbaril, Ciper-metrin, Clorotalonil, Clorpirifos Etil, Clorpirifos Metil, Cumafós, Diazinon, Diclofluanid, Diel-drin, Dimetoato, EPTC, Endosulfan alfa, Endosulfan beta, Endosulfan sulfato, Etion, Fenarimol, Fenitrothion, Fention, Fipronil, Fluvalinato, Fosalone, Fosmet, g-HCH (Lindano), HCB, Imazametabenz, Imidacloprida, Malation, Metalaxil, Metidation, Metiocarb, Metoxiclor, Mirex, Molinato, Nuarimol, Paratión metil, PCB 101, PCB 180, Pendimetalina, Pirimifos metil, Procimidona, Prometrina, Propacloro, Simazina, Terbutilazina, Terbutrina, Tetradifon, Trialato, Trifluralina, Vinclozolina, z-clorfeninfos

La encuesta se compone por un primer apartado con información personal del apicultor y las características zootécnicas del asentamiento muestreado. En el siguiente apartado se recoge información sanitaria del año anterior al muestreo y otras cuestiones a cerca del despoblamiento y la pérdida de colonias de abejas en Europa, en las que se incluyeron las cuestiones decididas en el Grupo COLOSS (www.coloss.org; Van der Zee y col., 2012). Estas preguntas cambiaron ligeramente en la encuesta del muestreo 2011 para adaptarlas a las directrices del grupo europeo. Por último, se incluyó un apartado sobre el control sanitario de la varroosis y otros tratamientos aplicados a las colmenas: producto, época de realización y posología.

A partir de las encuestas se construyó una base de datos con las respuestas de cada pregunta, posteriormente fueron archivadas en papel para futuras consultas.

5.3. Detección de patógenos

5.3.1. Examen macroscópico

Este examen macroscópico de las abejas adultas es muy útil para detectar la presencia o ausencia de ectoparásitos como *V. destructor*, *B. coeca*, *Tropilaelaps spp.*

5.3.1.1. *Varroa destructor*

La ausencia-presencia de este ácaro se determinó siguiendo el método de la OIE (2008a) con algunas modificaciones. Las abejas de cada caja se pesaron para determinar el número de abejas asumiendo que una abeja pesa 0,1 g. Posteriormente se extendieron sobre un papel de filtro blanco el cual permite visualizar los ácaros que se desprenden de las abejas. Los ácaros encontrados se almacenaron en tubos eppendorf de 1,5 ml a -20 °C. El número de abejas calculado junto con el número de varroas encontradas en cada muestra permitieron calcular diferentes porcentajes de parasitación:

- Porcentaje de parasitación del colmenar: se calculó el total de los ácaros encontrados en las seis colmenas del colmenar y el número de abejas analizadas.
- Porcentaje de parasitación máximo indica la colmena más parasitada de las seis que constituyen una muestra.
- Porcentaje de parasitación mínimo corresponde a la colmena menos parasitada.
- Porcentaje de colmenas positivas a varroa: es el número de colmenas parasitadas por *V. destructor* sobre el total de colmenas analizadas.

En el análisis de la prevalencia de *V. destructor* se consideró positivo al parásito en un colmenar cuando al menos una de las 6 muestras recibidas era positiva por la aparición de ácaros en las abejas adultas y/o en la cría.

En el caso de la cría de abejas, la ausencia/presencia del ácaro *Varroa destructor* se valoró al realizar la extracción de las larvas congeladas de sus celdillas con la ayuda de espátulas estériles. Los ácaros encontrados se almacenaron en tubos eppendorf de 1,5 ml a -20 °C, pero no se calculó el porcentaje de parasitación.

5.3.1.2. *Tropilaelaps spp.*

Este ácaro es morfológicamente distinto de *Varroa destructor* por lo que se puede diferenciar a simple vista o mediante un estereomicroscopio.

Se buscó la presencia de dicho ácaro mientras que se analizaban las muestras de abejas adultas y sus crías para detectar *Varroa destructor*.

5.3.1.3. *Braula spp.*

Este díptero áptero es fácilmente detectable a simple vista y presenta una morfología que no permite confusión con *V. destructor*. Como en el caso de *Tropilaelaps spp.*, su presencia se evaluó al mismo tiempo que se analizaron las muestras de abejas para la detección de *Varroa destructor*.

5.3.2. Diagnóstico molecular

Algunos patógenos internos requieren de técnicas más sensibles para su detección. En concreto, la técnica más comúnmente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa o *Polymerase Chain Reaction* (PCR), la cual requiere una serie de pasos previos para adecuar las muestras.

5.3.2.1. Procesado de las muestras

5.3.2.1.1. Tipo de muestra

Abejas adultas

Se tomaron 20 abejas por cada submuestra, que sumaron un total de 120 abejas por muestra, las cuales se introdujeron en una bolsa de plástico estéril con filtro (*BA6040 strainer bags*®) que retiene el exoesqueleto de la abeja y fueron almacenadas a -80°C, para preservar en buen estado el ADN hasta su posterior procesado y análisis.

Cría de abejas

En total se extrajeron de los panales 120 larvas y/o pupas repartidas de forma equitativa entre las seis muestras de cada paquete, se introdujeron en una bolsa de plástico estéril con filtro (*BA6040 strainer bags*®) y se conservan a -80°C.

5.3.2.1.2. Preparación del macerado

A cada bolsa de Stomacher con 120 abejas adultas o larvas y pupas se añadieron 18 ml de una solución tampón AL® (Nº Catálogo 19075, *Qiagen*) - *Carrier RNA*® (Nº Cat. 1010373, *Qiagen*). La finalidad de incorporar la solución tampón AL a las muestras fue proteger el RNA de las RNAsas de la abeja, las cuales se activan con el calor producido por la fricción generada por el homogeneizador al machacar la muestra. La adición del tampón AL® permite la manipulación de muestras de ácidos nucleicos sin necesidad de trabajar en condiciones de frío evitando su degradación a temperatura ambiente. La preparación del tampón AL® difiere en su concentración según el tipo de muestra, debido al mayor contenido de agua de las larvas en comparación con las abejas adultas: se utilizó solución tampón AL® 50% + *RNA-carrier*® 1 µg/ml para las muestras de abejas, y una solución tampón AL® 60% + *RNA-carrier*® 1,2 µg/ml para las muestras de cría. La concentración del *RNA-carrier*® fue de 2 µg/ml tampón AL en ambos casos.

Una vez añadidos los 18 ml de tampón AL en la bolsa con filtro (*BA6040 strainer bags*®) cada muestra se machacó en un homogeneizador Stomacher 80 (Microbiomaster) durante 120 segundos a baja velocidad, para evitar la formación de espuma ya que el tampón AL es una solución tensoactiva. A continuación, se añadieron

9 ml más de solución tampón AL® (*Qiagen*) y se machacó la muestra de nuevo 60 segundos más a baja velocidad.

El líquido de macerado de las abejas en la solución tampón se recogió en un tubo estéril de 50 ml que se centrifugó a 1811 G durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación se procedió de la siguiente manera:

El **sobrenadante** se utilizó para la determinación de virus. Para ello, con una pipeta estéril Pasteur de 1 ml desechable se recogieron 400 µl de sobrenadante de la zona intermedia del tubo (evitando arrastrar la grasa de la superficie o el sedimento del fondo) que se introdujeron directamente en una placa de incubación de 96 pocillos con un volumen de 2 ml/pocillo (*Deepwell*®, *Eppendorf*), la cual se congeló a -20°C hasta su posterior uso.

El **sedimento** se utilizó para la detección de organismos tales como *Acarapis woodi*, *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae*, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, tripanosomátidos y neogregarinos. Primeramente se retiró todo el sobrenadante y posteriormente, al sedimento se añadieron 3 ml de agua miliQ para resuspenderlo y facilitar el pipeteo. A continuación se tomaron 400 µl aproximadamente con una pipeta Pasteur de 1 ml y se introdujeron en una placa de 96 pocillos (*Collection microtube plate*®, N° Cat. 19560, *Qiagen*) con perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (*Sigma*), acto seguido la placa se agitó a 30 Hz durante 6 minutos en un triturador de tejidos (*TissueLyser*®, *Qiagen*) para facilitar la liberación del material genético y romper la pared quitinosa de las esporas de *Nosema* si las hubiera. Una vez agitada, se cogieron 150 µl, a los que se le añadieron 30 µl de tampón ATL® (N° Cat. 19076, *Qiagen*) y 20 µl de *proteínasa K*® (N° Cat. 19131, *Qiagen*) en una placa *Deepwell*®, y se incubó a 56°C durante una noche en un incubador (*Eppendorf Thermomixer*®).

Cada 20 muestras de abejas se introdujo un pocillo como testigo negativo de extracción que se preparó igual que una muestra normal que contenía únicamente la solución tampón AL®-Carrier RNA® sin abejas.

5.3.2.1.3. Extracción de ADN

Tras la incubación del macerado con *proteínasa K*® (*Qiagen*) se extrajo el ADN usando el protocolo de extracción “*BS96 DNA Tissue*” mediante la utilización del paquete comercial *DNeasy R Blood & Tissue*® (*Qiagen*) en el robot *Biosprint*® (*Qiagen*) como describió previamente Martín-Hernández y col. (2012). Las placas con el ADN extraído se congelaron a -20°C hasta su análisis molecular.

5.3.2.2. Identificación de *Acarapis woodi*

5.3.2.2.1. Diseño de nuevos cebadores

Se diseñó un nuevo método de PCR para la detección de *A. woodi*. Para ello primero se diseñaron los cebadores. Se seleccionó el gen mitocondrial COI, gen que codifica para la Citocromo Oxidasa subunidad I, para la amplificación de *A. woodi* mediante PCR. Las secuencias del COI del género *Acarapis* incluyen las especies *A. woodi*, *A. externus* y *A. dorsalis* (AB634837-AB634839, HQ162656-HA162662) disponibles en el *GenBank* (marzo de 2011) fueron recopiladas y alineadas utilizando el programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Herramientas/servicios/web/toolform.ebi?herramienta=clustalw2>). El objetivo era el diseño de cebadores específicos para *A. woodi*. La idoneidad de los cebadores (contenido en G+C y temperatura de anillamiento) se evaluó usando el programa *IDT OligoAnalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligAnalyzer>), y se añadieron colas de guanina al extremo 5' de cada cebador para equilibrar las temperaturas de fusión de la pareja de cebadores. Las posibles interacciones entre ellos como las estructuras en horquilla, homodímeros y heterodímeros se ensayaron usando el programa *AutoDimer* (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase//AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>). Su especificidad teórica se determinó mediante la realización de una búsqueda de zonas coincidentes utilizando BLAST.

Para determinar empíricamente la temperatura de fusión de la pareja de cebadores se realizó un gradiente de temperaturas de 55 a 65°C. Se utilizó DNA de muestras positivas a *A. woodi* y *A. externus* identificadas previamente (Garrido-Bailón y col., 2012) y agua como testigo negativo para determinar la especificidad de anillamiento de los cebadores.

Puesto que uno de los objetivos de este trabajo fue comparar la prevalencia con los datos anteriormente registrados en el período 2006-2007, fue necesario normalizar la sensibilidad de ambos pares de cebadores empleados: los diseñados por Garrido-Bailón (2012) frente a los desarrollados en este trabajo. Para ello, se estableció el límite de detección de las dos parejas de cebadores utilizando diluciones de ADN de una de las muestras positivas (1/5, 1/10, 1/15, 1/20 y 1/25). También se probaron diferentes cantidades de ADN (2,5-4 µl) con el nuevo par de cebadores para que coincidiese la sensibilidad entre ambas técnicas.

5.3.2.2.2. Condiciones de PCR

Todas las muestras se analizaron en un *Mastercycler ep gradient S*® (*Eppendorf*), bajo las siguientes condiciones: 21 µl de una mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de la enzima *FastStart PCR Master*® (Nº Cat. 04710452001, *Roche Diagnostic*), una concentración de 0,4 µM de cada cebador (AW-180 For y Rev), 0,2

mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,1% de Triton X-100 y, finalmente a esta mezcla se le añadieron 4 µl de ADN por muestra para alcanzar un volumen final de 25 µl. El programa del termociclador para analizar las muestras se estableció como sigue: 95°C durante 10 min; 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C, 45 s a 72°C y un paso de extensión final de 7 min a 72°C. Los fragmentos amplificados de PCR fueron analizados en un aparato de electroforesis capilar (Sistema de *QIAxcel*®, *Qiagen*), utilizando un cartucho de detección de ADN para dicho aparato (*QIAxcel* N° Cat. 929004, *Qiagen*).

El Dr McMullan (Irlanda) y José Villa (EEUU) nos proporcionaron los testigos positivos empleados en la PCR los cuales fueron confirmados mediante secuenciación directa en un estudio previo (Garrido-Bailón y col., 2012).

Se incluyeron testigos positivos y negativos en cada reacción de PCR y se analizaron en paralelo para detectar cualquier posible contaminación.

5.3.2.2.3. Clonación

La variabilidad de los cuatro aislados seleccionados (E2, 595, 1431 y 1953) también se evaluó por medio de la clonación y secuenciación (números de acceso HG967529-HG967561). Para ello, se amplificó el gen COI por PCR usando los mismos cebadores empleados para el diagnóstico, pero utilizando en este caso la enzima *Expand High Fidelity*^{PLUS} *PCR System*® (*Roche Diagnostics*) que fue elegida por su actividad 3'-5' 'exonucleasa' de corrección de errores. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 1,5 U de mezcla de *Expand High Fidelity*^{PLUS} *PCR System*®, 5 µl de tampón 2 (con MgCl₂), 0,4 µM de cada cebador, dNTPs 200 µM (*Roche Diagnostics*), 0,5 µl BSA (0,2 mg / ml), 0,1% de Triton X-100 y 4 µl de ADN de la dilución óptima para cada muestra. El programa de PCR consistió en: 2 min a 94°C; 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 59°C y 1 min a 68°C; y una extensión final de 7 min a 68°C. Se incluyeron testigos negativos en cada reacción.

Los productos de PCR se purificaron con el paquete comercial de Purificación de PCR *QIAquick*® (*Qiagen*) en el robot *QIAcube* (N° Cat. 28104, *Qiagen*) y se clonaron en el vector *pCR2.1-TOPO*® usando el paquete comercial *TOPO TA Cloning*® (*Invitrogen*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.2.2.4. Secuenciación

Se seleccionaron cuatro muestras positivas a *A. woodi* (A9, E1, E2 y F10) al azar y se analizaron por secuenciación directa de los fragmentos amplificados (números de acceso HF945444-HF945447). Además se seleccionaron tres muestras positivas a *A. woodi* como referencia (Garrido-Bailón y col., 2012) que fueron analizadas y secuenciadas para confirmar la viabilidad de la técnica.

Los plásmidos recombinantes se purificaron utilizando el paquete comercial *QIAprep Spin Miniprep*® (Qiagen) y ambas cadenas de los insertos se secuenciaron con cebadores M13 en un secuenciador automático ABI3730XL utilizando Big Dye (*Applied Biosystems*) en el servicio de secuenciación del Parque Científico de Madrid. Las secuencias fueron analizadas con el programa *CodonCode Aligner* (*CodonCode Corporation*) y las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en *GenBank* utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

5.3.2.2.5. Análisis filogenético

Todas las secuencias de COI del género *Acarapis* disponibles en *GenBank* (julio de 2013: AB634837-AB634839, HQ162656-HQ162662) se alinearon con las obtenidas en el presente trabajo utilizando *MUSCLE* (Edgar, 2004) y, posteriormente, se editaron con *Bioedit* (Hall, 1999).

Las secuencias se analizaron visualmente utilizando el programa *CodonCode Aligner* (*CodonCode Corporation*) y se compararon con las secuencias de referencia, a continuación se depositaron en *GenBank*.

La divergencia sinónima (K_s) entre secuencias se calculó aplicando el método de Nei-Gojobori (Nei y Gojobori, 1986) con la corrección de Jukes-Cantor implementado en MEGA v5.05 (Tamura y col., 2011). Con el mismo programa se generó una filogenia *neighbor-joining* para lugares sinónimos, cuya fiabilidad se evaluó mediante un procedimiento de remuestreo (*bootstrap*) de 3.000 réplicas.

5.3.2.3. Identificación del género *Nosema*

5.3.2.3.1. Condiciones de PCR

El diagnóstico de *N. apis* y *N. ceranae* se realizó mediante una PCR triplex descrita por Martín-Hernández y col. (2012) que permitió diferenciar en un mismo paso ambas especies donde además se incluyó un control interno localizado en la subunidad I de la enzima mitocondrial Citocromo Oxidasa (COI) para comprobar si el ADN se encontraba en un correcto estado de conservación.

Para llevar a cabo la PCR se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µl que contenía: 12,5 µl de *FastStart PCR Master*® (Nº 04710452001, *Roche Diagnostic*), 0,4 µM de cada cebador de *Nosema apis* (APIS-F y APIS-R, Tabla 6) y *Nosema ceranae* (MITOC-F y MITOC-R, Tabla 6), 0,03 µM del par de cebadores del COI (COI-F y COI-R, Tabla 6), 0,2 mg/ml de BSA, 0,1% Triton X-100 and 2,5 µl de ADN muestra.

Tabla 6.- Secuencias de los cebadores de las dos especies del género *Nosema*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Especificidad
APIS-F	<u>GGGG</u> GCGATGCTTTGACGTACTATGTA	321	<i>N. apis</i>
APIS-R	<u>GGGGGG</u> CGTTTAAATGTGAAACAACTATG		
MITOC-F	<u>CGGCG</u> ACGATGTGATATGAAAATATTAA	218	<i>N. ceranae</i>
MITOC-R	<u>CCCGG</u> TCACTCTCAAACAAAAACCG		
COI-F	GGGTCCAAGACCAGGAAGCTGGAT	119	COI
COI-R	GGGTCCAAGACCAGGAAGCTGGAT		

Se utilizó un sistema de gelificación (Registrado por *Biotoools*) en el que la enzima polimerasa (*HotSplit DNA polimerasa*®, *Biotoools*), las tres parejas de cebadores (Tabla 6), BSA y Triton X-100 se encuentran gelificadas en cada pocillo a las concentraciones necesarias. *Biotoools* fabricó unas placas de PCR con la mezcla de reacción gelificada, a la cual únicamente se le añadió agua (22,5 µl) y los 2,5 µl de ADN muestra. Esto redujo la manipulación de los reactivos evitando posibles problemas de contaminación. Posteriormente se introdujo todo en un termociclador Mastercycler®Ep gradient S (*Eppendorf*) y se utilizó el programa compuesto por: 10 min a 95°C; 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 95°C, 30 s de elongación a 61,8°C y 45 s de extensión a 72°C; y una última etapa de elongación a 72°C durante 7 min. Todos los productos de PCR fueron analizados utilizando un aparato de electroforesis capilar *QIAxcel System*® (*Qiagen*) con el kit *QIAxcelDNA Screening Resolution*® (*Qiagen*, N° 929002).

Los testigos positivos empleados en PCR procedían de muestras confirmadas por secuenciación y los controles negativos también fueron incluidos en todas las reacciones de PCR.

5.3.2.4. Identificación de neogregarinos y tripanosomátidos

5.3.2.4.1. Condiciones de PCR

Se empleó la técnica de PCR descrita por Meeus y col. (2010) para el diagnóstico de los tripanosomátidos y neogregarinos. En este caso, el diagnóstico de ambos organismos se realizó por separado, ya que a la hora de comenzar los análisis no se disponía de un control positivo para el neogregarino *Apicystis bombi*. Por el contrario, el control positivo para el tripanosomátido *Crithidia mellificae* fue cedido por el equipo de Meeus.

Las condiciones de la reacción de PCR para tripanosomátidos en un volumen final de 25 µl fueron: 12,5 µl de *FastStart PCR Master*® (N° Cat. 04710452001, *Roche Diagnostic*), 0,5 µM de cada cebador CRI-SEF/SER (Meeus y col., 2010) y 2,5 µl del ADN muestra.

En el caso de los neogregarinos las condiciones de PCR para un volumen final de 25 µl son: 12,5 µl de *FastStart PCR Master*[®] (Nº Cat. 04710452001, *Roche Diagnostic*), 0,5 µM de los cebadores Api-NeoF: CCAGCATGGAATAACATGTAAGG y Api-NeoR: GACAGCTTCCAATCTCTAGTCG y 2,5 µl del ADN muestra.

El programa del termociclador utilizado fue el mismo para ambos: 10 min a 95°C; 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C y 45 s a 72°C; y una extensión final de 7 min a 72°C. Posteriormente los productos de PCR se revelaron en el aparato *QIAxcel System*[®] (*Qiagen*) con el Kit *QIAxcel DNA Screening*[®] (*Qiagen*, Nº 929004).

5.3.2.4.2. Clonación

Dado que el gen 18S rDNA resultó inadecuado para clasificar los tripanosomátidos que infectan a las colonias de abejas (Cepero y col., 2014a), se escogieron 4 muestras positivas (324, 325, 328 y 1980) al azar y una muestra de la cepa de referencia de *Crithidia mellificae* (ATCC) las cuales fueron amplificadas en el locus GAPDH utilizando la pareja de cebadores CrGD-1 F y CrGD-1R. Como los cebadores CrGD no produjeron un fragmento amplificado de ATCC30254, esta cepa fue amplificada por PCR de nuevo con los cebadores Tryp-1F y Tryp-1R, un conjunto de cebadores que debe amplificar la mayoría de especies de *Crithidia* y *Leptomonas* publicadas en *GenBank* hasta la fecha. Aunque también se amplificaron con los cebadores de diagnóstico (Cri-SEF/SER) y otras dos parejas de cebadores llamados gp63-F/R y CytB-F/R cuyas secuencias aparecen en la Tabla 7.

Tabla 7.- Secuencias de los cebadores empleados para clonar las muestras de tripanosomátidos.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Tª de fusión
CrGD-1F	GGTCGCCGTGGTGGAC	64 °C
CrGD-1R	CGTCGCCGTGTAGGAGTGA	
Tryp-1F	CCGAGTACTTCKCSTACCAG	55 °C
Tryp-1R	AGCCGAGGATGCCCTTCAT	
gp63-F	ACGAGATCGCACATTCCTC	58 °C
gp63-R	GGAAGTGTGTACGTTGTCTG	
CytB-F	TGTGGTGTGTGTTTAGC	50 °C
CytB-R	CGTCTGAACTCATAAAATAATG	

En todas las reacciones de PCR se utilizó la enzima *Expand High Fidelity*^{PLUS} *PCR System*[®] (*Roche Diagnostics*) y se añadió 5 µl de ADN a cada reacción hasta alcanzar un volumen final de 25 µl.

Los fragmentos amplificados de tripanosomátidos y neogregarinos se clonaron usando el paquete comercial *Topo TA Cloning*[®] (*Invitrogen*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.2.4.3. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron con los cebadores M13 en un secuenciador automático ABI3730XL usando *Big Dye* (*Applied Biosystems*) siguiendo los pasos del apartado 5.3.2.2.4.

5.3.2.4.4. Análisis filogenético

La estima de la diversidad total y por pares de secuencias se obtuvo utilizando el estadístico π (número promedio de diferencias por posición entre dos secuencias tomadas al azar) y aplicando la corrección de Jukes – Cantor (1969). El error estándar se calculó mediante un remuestreo (*bootstrap*) de 3000 réplicas, empleando el programa MEGA v.5.05 (Tamura y col., 2011).

Este *software* también se utilizó para construir una filogenia de máxima verosimilitud bajo el modelo GTR+G+I, que asume un modelo general de tiempo reversible, una distribución *gamma*, y que algunas posiciones se mantienen invariables. Este fue seleccionado como el más adecuado aplicando el criterio de información de Akaike (AIC) implementado como herramienta en MEGA. La robustez de la topología del árbol se evaluó mediante un remuestreo de 500 réplicas.

5.3.2.5. Identificación de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*

5.3.2.5.1. Condiciones de PCR

La detección de los tres patógenos que afectan a la cría de abejas se realizó a través de una PCR triplex descrita por Garrido-Bailón y col. (2013) con un *Mastercycler Ep gradient S*® (*Eppendorf*) para 50 μ l de reacción compuesta por: 25 μ l de *FastStart PCR Master*® (*Roche Diagnostic*), 0,09 μ M de los cebadores Ascós-F/R (Tabla 8), 0,6 μ M para el par de cebadores Meli-F/R (Tabla 8), 0,05 μ M para los cebadores Paen-F/R (Tabla 8), 0,2 mg/ ml BSA, 0,1% Triton X-100 y 5 μ l de ADN muestra.

Tabla 8.- Cebadores utilizados en PCR triplex para la detección de *A. apis*, *M. plutonius* y *P. larvae* (Garrido-Bailón y col., 2013)

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Especificidad
Ascós-F	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	136	<i>A. apis</i>
Ascós-R	GCTAGCCAGGGGGGAATAA		
Meli-F	GTAAAAGGCGCTTTCGGGT	281	<i>M. plutonius</i>
Meli-R	GAGGAAAACAGTTACTCTTCCCCTA		
Paen- F	AAGTCGAGCGGACCTTGTTTC	973	<i>P. larvae</i>
Paen- R	TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG		

El programa empleado en el termociclador fue el siguiente: 95°C durante 10 min; 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 59°C y 45 s a 72°C; más un paso de extensión final a 72°C durante 7 min.

En cada reacción de PCR se añadió un control negativo y positivo con la mezcla de los tres patógenos. Los controles positivos se prepararon a partir de muestras con claros signos clínicos en el caso de *A. apis* y *P. larvae*. Sin embargo, en el caso de *M. plutonius* se recurrió a muestras positivas obtenidas en un estudio previo (Garrido-Bailón, 2012). Los fragmentos amplificados obtenidos de la PCR se revelaron utilizando un aparato de electroforesis capilar (*QIAxcel System*®, *Qiagen*) con el paquete comercial *QIAxcel DNA Screening Resolution*® (Nº Cat. 929002, *Qiagen*).

5.3.2.6. Identificación de virus

5.3.2.6.1. Extracción de RNA y obtención de DNAcopia por retrotranscripción

La extracción del ARN para el estudio de los virus se realizó en el sobrenadante de las muestras de abejas adultas (aparatado 5.3.2.1.2.) siguiendo el método descrito por Antúnez y col. (2012b). Brevemente, consistió en incubar 400 µl de sobrenadante con proteasa (*Qiagen*) a 70°C durante 15 min. A continuación, las muestras se sometieron a la extracción mediante el método de extracción *BS96 DNA Tissue* (*Qiagen*) en el robot *Biosprint*® (*Qiagen*) utilizando el paquete comercial *DNeasy R Blood & Tissue*® (*Qiagen*). Tras este paso, se obtuvo la extracción de los ácidos nucleicos totales de la muestra. Posteriormente, se sometieron a la digestión del ADN con DNasa (*DNasa I*®, *Qiagen*) para eliminar completamente el ADN genómico. El ARN total recuperado se usó inmediatamente para generar cDNA utilizando el paquete comercial *Quantitec Reverse Transcription*® (*Qiagen*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los testigos negativos y positivos se realizaron en paralelo para cada paso, tanto en la extracción de ácidos nucleicos como en las reacciones de transcripción inversa (RT o retrotranscripción). Una vez obtenido el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso. La técnica de diagnóstico escogida para el análisis de la mayoría de los virus fue la PCR cuantitativa (Q-PCR).

5.3.2.6.2. β-actina

5.3.2.6.2.1. Condiciones de PCR

5.3.2.6.2.1.a. Q-PCR con sondas TaqMan

Se utilizó la expresión del gen de la β-actina de la abeja como método para determinar la integridad del ARN en la muestra. Para ello se utilizaron los cebadores y sonda TaqMan diseñados en dicho gen (Martín-Hernández, sin publicar Tabla 9): ACT-F 5'-GTATGCCAACACTGTCCTACT-3', ACT-R 5'-AAGAATTGACCCACCAATCCA-3' y ACT-P 5'-CCTAGCACCATCCACCATGAAAATTAAGATCATC-3').

La preparación de la mezcla de reacción para 20 µl de volumen total se componía de: 10 µl de *LightCycler*® 480 Probes Master (Nº Cat. 04887301001, *Roche Diagnostics*), 0,3 µM de los cebadores ACT-F y ACT-R, 0,1 µM de la sonda ACT-P y 5 µl

de cDNA muestra. En el programa de PCR cuantitativa se aplicó una temperatura de 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 10s a 95°C y 40s a 60°C. Al tratarse de una PCR a tiempo real no se requería un revelado posterior y los datos se analizaron a tiempo real con el aparato “*LightCycler® 480*” (Roche) estableciendo como positivos todas aquellas muestras que amplificaron justo antes del ciclo 37 ($C_p \leq 36,99$). En cada reacción de PCR cuantitativa se utilizó un testigo negativo y positivo, a partir de una muestra con ADN en buenas condiciones.

5.3.2.6.2.1.b. Q-PCR con SYBR Green

Las muestras fueron analizadas siguiendo el método de Antúnez y col. (2012b) para la detección del RNAm que codifica la expresión de la proteína β -actina de la abeja. Los cebadores utilizados para dicho análisis producen un fragmento amplificado de 156 pb, son: BACTIN 1 (directo) 5'-ATGCCAACAACCTGTCCTTTCTGG-3' y BACTIN 2 (reverso) 5'-GACCCACCAATCCATACGGA-3' (Tabla 9).

La mezcla de reacción para un volumen de 20 μ l estaba compuesta por: 10 μ l de *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Nº Cat. 04707516001, Roche Diagnostics), 0,5 μ M de los cebadores BACTIN 1/2 y 5 μ l de cDNA muestra. La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en un “*LightCycler® 480*” (Roche) y consistió en un primer paso de preincubación a 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 10s a 95°C, 10 s a 50°C y un último paso de 72°C durante 14s.

Las muestras positivas fueron aquellas que mostraron un valor de C_p inferior a 37 ciclos y que presentaron una temperatura de fusión incluida en el rango de 81,5-83,5°C establecida en el trabajo de Antúnez y col. (2012b).

5.3.2.6.2.1.c. Estudio de sensibilidad comparativo de las técnicas

Para el diagnóstico molecular de los virus DWV y BQCV se empleó la técnica de PCR cuantitativa por medio de sondas TaqMan, sin embargo en un total de 100 muestras escogidas al azar se realizó un diagnóstico de estos dos virus utilizando PCR cuantitativa con SYBR Green para comprobar si ambas técnicas presentaban diferente grado de sensibilidad.

5.3.2.6.2.2. Secuenciación

Se enviaron varias muestras a secuenciar para lo cual se siguieron las mismas medidas que en el apartado 5.3.2.2.4.

5.3.2.6.3. Virus Alas Deformadas (DWV)

5.3.2.6.3.1. Condiciones de PCR

5.3.2.6.3.1.a. Q-PCR con sonda TaqMan

La técnica elegida para la detección del Virus de las alas deformadas (DWV) fue una PCR a tiempo real (Q-PCR) con unos cebadores diseñados por Chantawannakul y col. (2006) combinados con sondas de fluorescencia: DWV 9587F (directo) 5'-CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA-3', DWV 9711R (reverso) 5'-ATTCAGGACCCACCCA AAT-3' y DWV 9627T (sonda) 5'-CATGCTCGAGGATTGGGTCGTCGT-3' (Tabla 9).

Las condiciones de PCR cuantitativa para un volumen final de 20 µl fueron las siguientes: 10 µl de *LightCycler® 480 Probes Master* (Nº Cat. 04887301001, *Roche Diagnostics*), 0,3 µM del par de cebadores, 0,1 µM de la sonda y 5 µl de cDNA muestra. En el programa de PRC se aplicó una temperatura de 95°C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 10 s a 95°C y 40 s a 60°C. Al tratarse de una PCR a tiempo real no necesitó un revelado posterior y los datos se analizaron directamente en el aparato "*LightCycler® 480*" (*Roche*) estableciendo como positivos todas aquellas muestras que amplificaron justo antes del ciclo 37 ($C_p \leq 36,99$). En cada reacción de Q-PCR se utilizó un control negativo y positivo cedido por la Unidad Nacional de Apicultura de la Agencia de Investigación en Alimentación y Medio Ambiente (*Food and Environment Research Agency* (FERA), York).

5.3.2.6.3.1.b. Q-PCR con SYBER Green

En 100 muestras escogidas al azar se realizó el diagnóstico de DWV aplicando el método de Antúnez y col. (2012b). Los cebadores empleados para la detección de este virus produjeron un fragmento amplificado de 250 pb y son: DWV1 (directo) 5'-CTGTATGTGGTGTGCCTGGT-3' y DWV2 (reverso) 5'-TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT-3' (Tabla 9).

La mezcla de reacción para un volumen de 20 µl estaba compuesta por: 10 µl de *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Nº Cat. 04707516001, *Roche Diagnostics*), 0,5 µM de cada cebador y 5 µl de cDNA muestra. La reacción de Q-PCR se llevó a cabo en un "*LightCycler® 480*" (*Roche*) y consistió en un primer paso de preincubación a 95°C durante 10 min y 45 ciclos de 10 s a 95°C, 10 s a 50°C y 14 s a 72°C.

Las muestras se consideraron positivas cuando las curvas de fusión presentaron una temperatura de desnaturalización entre 80,5 – 84°C y amplificaron antes del ciclo 37 ($C_p \leq 36,99$).

5.3.2.6.3.2. Secuenciación

Se emplearon los programas *Codon Code Aligner* y *BioEdit* para procesar las secuencias a partir de las cuales se calculó su temperatura de fusión mediante el programa *Oligo Calculator* y se compararon con las temperaturas de fusión obtenidas en la PCR. Al analizar las muestras amplificadas con SYBR Green se observó que las

curvas de fusión presentaban distintos tamaños de producto asociados a diferentes temperaturas de fusión, y por ello se escogieron 16 muestras que se agruparon según las temperaturas de fusión encontradas: 75-76°C (6), 81°C (3), 82,5°C (3) y 83-84°C (4). Además se secuenciaron seis muestras amplificadas con sondas TaqMan. Las 22 muestras se procesaron como en el apartado 5.3.2.2.4.

5.3.2.6.4. Virus Realeras Negras (BQCV)

5.3.2.6.4.1. Condiciones de PCR

5.3.2.6.4.1.a. Q-PCR con sonda TaqMan

El diagnóstico del Virus de las Realeras Negras (BQCV) se realizó mediante una PCR a tiempo real (Q-PCR) utilizando unos cebadores desarrollados por Chantawannakul y col. (2006) que funcionan mediante sondas TaqMan de fluorescencia, marcadas en los extremos con 5'-FAM y 3'-TAMRA: BQCV9195F (directo) 5'-GGTGCGGGAGATGATATGGA-3', BQCV265R (reverso) 5'-GCCGTCTGAGATGCATGAATAC-3' y BQCV8217T (sonda) 5'-TTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC-3' (Tabla 9).

Las condiciones de Q-PCR fueron las mismas que se utilizaron con el virus de las alas deformadas (apartado 5.3.2.6.3.1.a.)

5.3.2.6.4.1.b. Q-PCR con SYBR Green

Se eligieron 100 muestras al azar que fueron analizadas siguiendo el método de Antúnez y col. (2012b) para la detección del virus de las realeras negras. Los cebadores utilizados para dicho análisis generan un fragmento amplificado de 305 pb, son: BQCV1 (directo) 5'-AAGGGTGTGGATTTTCGTCAG-3' y BQCV2 (reverso) 5'-GGCGTACCGATAAAGATGGA-3' (Tabla 9).

La reacción de Q-PCR se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el punto 5.3.2.6.3.1.b. Las muestras que se consideraron positivas fueron aquellas que cumplieron los siguientes requisitos: mostrar curvas de fusión con una temperatura de fusión comprendida entre 81,5 – 83,0 °C y amplificar antes del ciclo 37 ($C_p \leq 36,99$).

5.3.2.6.4.2. Secuenciación

Las secuencias se procesaron utilizando los programas *CodonCode Aligner* y *BioEdit*, posteriormente se calculó su temperatura de fusión con el programa *Oligo Calculator* y se comparó con la obtenida en la PCR cuantitativa para el caso de las muestras amplificadas con SYBR Green. Se seleccionaron, por un lado, 11 muestras analizadas con SYBR Green las cuales se agruparon según las distintas temperatura observadas en las curvas de fusión: 77°C (3 muestras), 81°C (3), 82°C (3), 83°C (1) y 85°C (1), y, por otro lado, 5 muestras amplificadas con sondas TaqMan divididas en tres grupos según su temperatura de fusión: 81°C (2), 82°C (2) y 83°C (1). Todas ellas

fueron secuenciadas empleando el mismo método descrito en el apartado 5.3.2.2.4 para comprobar si sus secuencias pertenecen al virus de las realeras negras.

5.3.2.6.5. Complejo ABPV-KBV-IAPV

5.3.2.6.5.1. Condiciones de PCR

Se analizó la presencia de los siguientes virus en una única reacción de PCR: Virus Kashmir (KBV), Virus de la Parálisis Aguda (ABPV) y Virus de la Parálisis Aguda variedad Israelí (IAPV), que se simplifican como complejo ABPV-KBV-IAPV para dar nombre a los cebadores descritos por Francis y Kryger (2012). Los cebadores utilizados fueron: AKI-F 5'-CTTTCATGATGTGGAACTCC-3' y AKI-R 5'-AAACTGAATAATACTGTGCGTA-3' (Tabla 9) que dan lugar a un solo fragmento amplificado con un tamaño de 101 pb para los tres virus.

Las condiciones de PCR para un volumen de 25 µl fueron las siguientes: 12,5 µl de *FastStart PCR Master*® (Nº Cat. 04 710 452 001, *Roche Diagnostic*), 0,4 µM de los cebadores AKI-F/R y 2 µl de cDNA muestra. Siempre se añadió un control de PCR negativo y otro positivo, cedido por el Dr. Per Kryger (Dinamarca).

El programa usado para llevar a cabo la PCR consistió en un primer paso de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 59°C, 45s a 72°C; y un último paso de 7 min a 72°C. Los resultados se revelaron en un robot de electroforesis capilar (*QIAxcel System*®, *Qiagen*), usando el Kit *QIAxcel DNA Screening*® (*Qiagen*, Nº Cat. 929004).

5.3.2.6.5.2. Secuenciación

El producto de PCR se purificó con el paquete comercial *QIAprep Spin Miniprep*® (*Qiagen*) y posteriormente se secuenció con los cebadores M13 en un secuenciador automático ABI3730XL usando *Big Dye* (*Applied Biosystems*) siguiendo los pasos del apartado 5.3.2.2.4.

5.3.2.6.6. Virus del Lago Sinai

5.3.2.6.6.1. Condiciones de PCR

La presencia/ausencia del Virus del Lago Sinai (LSV) se analizó utilizando el método descrito por Ravoet y col. (2013) quienes desarrollaron los siguientes cebadores degenerados: LSVdeg-For 5'-GCCWCGRYTGTGGTYCCCCC-3' y LSVdeg-Rev 5'-GAGGTGGCGGCGCSAGATAAAGT-3' (Tabla 9), los cuales producen un fragmento amplificado de 600 pb.

Las condiciones de PCR para un volumen final de 25 µl fueron: 12,5 µl de *FastStart PCR Master*® (Nº Cat. 04710452001, *Roche Diagnostic*), los cebadores LSVdeg-F/R a una concentración de 2 µM y 2,5 µl de cDNA muestra. El testigo positivo

utilizado para la PCR fue cedido por el equipo de Meeus (Bélgica), también se añadió un testigo negativo en cada reacción de PCR.

El programa utilizado en el termociclador consistió en un primer paso de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 60°C 30 s, 45 s a 72°C; y un último paso de 7 min a 72°C. Los resultados se revelaron mediante el uso de una electroforesis capilar en el aparato *QIAxcel System*® (*Qiagen*), con el Kit *QIAxcel DNA Screening*® (*Qiagen*, Nº 929004).

Tabla 9.- Resumen de las condiciones de PCR de todos los virus estudiados

Organismo	Autor	Tipo PCR	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Condiciones PCR			Fragmento amplificado (pb)
					Concentración (μM)	Tª fusión (°C)	Cantidad cDNA(μl)	
B-actina	Martín-Hernández *	Q-PCR	ACT-F (directo)	GTATGCCAACACTGTCCTACT	0,3			
			ACT-R (reverso)	AAGAATTGACCCACCAATCCA	0,3	60	5	
			ACT-P (sonda)	CCTAGCACCATCCACCATGAAATTAAGATCATC	0,1			
	Yang & Cox-Foster (2007)	SYBR Green	BACTIN 1 (directo)	ATGCCAACACTGTCTTTCTGG	0,5	50	5	156
BQCV	Chantawannakul (2006)	Q-PCR	BACTIN 2 (reverso)	GACCCACCAATCCATACGGA	0,3			
			BQCV 9195F (directo)	GGTGCGGGAGATGATATGGA	0,3	60	5	
			BQCV 265R (reverso)	GCGGTCTGAGATGCATGAATAC	0,3			
			BQCV 8217T (sonda)	TTTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC	0,1			
DWV	Kukielka y col (2008)	SYBR Green	BQCV 1 (directo)	AAGGGTGTGGATTTCGTACAG	0,5	50	5	305
			BQCV 2 (reverso)	GCGGTACCGATAAAGATGGA	0,3			
			DWV 9587F (directo)	CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA	0,3	60	5	
			DWV 9711R (reverso)	ATTCAGGACCCACCCCAAAT	0,1			
ABPV, KBV, IAPV	Francis & Kryger (2012)	PCR convencional	DWV 9627T (sonda)	CATGCTCGAGATTGGGTGCTCGT	0,5	50	5	250
			DWV 1 (directo)	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT				
			DWV 2 (reverso)	TTCAAAACAATCCGTGAATATAGTGT				
			AKI-F	CTTTTCATGATGTGGAACTCC	0,4	59	2	101
LSV	Ra voet y col (2013)	PCR convencional	AKI-R	AAACTGAATAATACTGTGCGTA				
			LSVdeg-F	GCCWCGRYGTGTTGGTYCCCCC	2	60	2,5	600
			LSVdeg-R	GAGGTGGCGCGCSAGATAAAGT				

*Sin publicar

5.3.2.7. Identificación de *Aethina tumida*

5.3.2.7.1. Procesado del fondo de la colmena

Se pesaron 5 g de cada muestra del fondo de colmena y fueron introducidos en una bolsa con filtro (*BA6040 strainer bags*®) a la que se añadió 18 ml de agua miliQ, se machacó en un homogenizador (*Stomacher 80*®, *Biomaster*) durante 120 segundos. Posteriormente se añadieron 9 ml más de agua miliQ y se machacó de nuevo otros 60 segundos. El macerado obtenido fue introducido en un tubo falcom estéril de 50 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm (1811 G). Finalmente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua miliQ.

Para abaratar costes, en otro tubo se mezclaron las muestras procedentes de cada Comunidad Autónoma cogiendo 50 mg de cada una y añadiendo 3 ml de agua MiliQ a cada tubo. A continuación, cada conjunto de muestras fue homogeneizado y 400 µl fueron introducidos en una placa de incubación de 96 pocillos con un volumen de 2 ml por pocillo (*Deepwel*®, *Eppendorf*) donde algunos pocillos solo contenían agua como controles negativos, y se congelaron a -20°C hasta su uso. El sedimento de las muestra se conservó a -20°C para poder realizar el análisis independiente de cada muestra en el caso que alguna región resultase positiva.

Para comprobar que la técnica era capaz de detectar una larva en una mezcla de muestras se cogió una larva que fue lavada con agua MiliQ repetidas veces para eliminar el alcohol donde estaba conservada, a continuación se tomaron 5 g de restos del fondo de una colmena que fueron introducidos en una bolsa con filtro junto con la larva y el macerado se procesó siguiendo los mismos pasos que para una muestra normal hasta obtener el sedimento resuspendido en 1 ml de agua. Se pesaron 50 mg del sedimento obtenido que se añadieron al tubo con la mezcla de 34 muestras de Madrid. Se eligió Madrid por ser la comunidad con mayor número de muestras. Tras mezclar bien la muestra se recogieron 600 µl para realizar la extracción de ADN utilizando los reactivos del kit comercial para el robot *Magna Pure*® (*Roche*).

5.3.2.7.2. Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción del ADN se siguió el proceso descrito en el apartado 5.3.2.1.3.

5.3.2.7.3. Condiciones de PCR

En la detección de este organismo se empleó la técnica de PCR cuantitativa desarrollada por el grupo de Ward y col. (2007), con las siguientes condiciones de Q-PCR: en un volumen final de 20 µl se mezclaron 10 µl de *LightCycler*® 480 *Probes Master* (Nº Cat. 04887301001, *Roche Diagnostic*), los cebadores SHB -F/R con una concentración de 300 nM y 200 nM de sonda y 1 µl de muestra en el aparato

LightCycler® 480 (Roche). El programa utilizado en la Q-PCR estaba compuesto por 2 min a 50°C min, 95°C durante 10 min y 40 ciclos de 60°C 1 min más 15 s a 95°C.

Los controles positivos utilizados en la PCR procedieron de larvas y adultos enviados por el Dr. J. Ellis.

La eficiencia de la reacción de PCR se evaluó por triplicado utilizando ADN extraído de 2 larvas y 2 adultos de *A. tumida*.

5.4. Detección físico-química de plaguicidas en polen

De todas las muestras de polen de reserva que se recogieron a lo largo del año 2010 se tomaron 100 muestras compuestas por 10 muestras escogidas al azar de cada Comunidad Autónoma participante. Estas muestras se procesaron separando manualmente la cera y el polen con espátulas estériles. Posteriormente estas muestras se enviaron al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid donde fueron analizadas por el equipo del Doctor Bernal donde se hizo un estudio de 60 compuestos diferentes (Tabla 5) utilizando 100 g de polen de cada muestra. Para la detección de los distintos tipos de plaguicidas se realizó un análisis multi-residuo *QuEChERS* por cromatografía de gases y de líquidos con detector de espectrometría de masas (Bonmartin y col., 2003 citado por Bernal y col., 2010), también se emplearon métodos específicos para la detección de fipronil e imidacloprida.

5.5. Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos de los diferentes apartados de las encuestas se recopilaron en una base de datos y se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS. 14.0. Los tests estadísticos empleados fueron, por un lado, la prueba de Chi-cuadrado de Pearson para comparar la distribución y prevalencia a nivel nacional de los patógenos analizados ambos años de estudio y, por otro lado, la prueba de Fisher para comparar las medias calculadas para los distintos porcentajes de parasitación de varroa con respecto a la aplicación adecuada o incorrecta de los tratamientos acaricidas. Las proporciones de apicultores que realizaron los tratamientos para el control de la varroosis de forma correcta o incorrecta y su posible repercusión en la positividad de las muestras al ácaro entre el año 2010 y 2011 fueron comparadas con la prueba Chi-cuadrado de Pearson. También se utilizó la prueba Chi-cuadrado (análisis univariante) para conocer la distribución de todos los patógenos analizados en este estudio en función de la presencia de los parásitos de mayor importancia como son *V. destructor*, *N. ceranae* y *N. apis* agrupando los años 2010 y 2011.

Gracias a las coordenadas GPS aportadas por los apicultores, y utilizando la localización del centro del municipio en los casos en que no se disponía de dichas coordenadas, a través del Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas -

SigPac- (<http://sigpac.mapa.es/fega/visor/>) se pudo crear mapas con la distribución de los patógenos en relación con la ubicación de cada colmenar y su clasificación por pisos climáticos utilizando el programa *Geographical Information Systems*, v. 9.0.

A la hora de analizar las prevalencias por pisos de los distintos patógenos se agruparon los resultados obtenidos en los dos años de estudio y se analizaron como una única base de datos, con la finalidad de saber qué pisos bioclimáticos presentan significativamente más muestras positivas de cada patógeno estudiado con respecto al total de pisos del país. A partir de las prevalencias medias en los distintos pisos climáticos se creó un mapa de distribución, utilizando el paquete de análisis de sistemas de información geográfica *ArcGis* 9.0., con las muestras positivas y negativas para cada uno de los patógenos analizados.

Para el análisis de los datos extraídos de las encuestas sobre la pérdida de colonias de abejas los dos años de estudio se creó una matriz de datos a partir de la cual, en primer lugar, se calculó la prevalencia de los distintos patógenos, la presencia o ausencia de la pérdida de colonias y la presencia o ausencia de despoblamiento para hacer un análisis descriptivo de la situación. A continuación, se obtuvieron varias tablas de contingencia 2x2 con el programa SAS 9.4 para evaluar de forma independiente la posible relación entre cada patógeno y la existencia de pérdidas de colonias o frente a la presencia de despoblamiento declarado por los apicultores en sus explotaciones, y en ambos casos se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrado (análisis univariable). Por último, con el programa IBM SPSS 22 se construyó un árbol de decisión (análisis multivariable) basado en el algoritmo Chaid, tanto para la pérdida de colonias como para el despoblamiento y cada uno con su correspondiente curva ROC, para comprobar la relación y el grado de influencia entre las distintas variables utilizadas como factores de riesgo (patógenos) así como si son adecuadas para explicar el despoblamiento y la muerte de colonias de abejas a nivel nacional.

6. VIGILANCIA PASIVA: muestras de casos clínicos

6.1. Obtención de datos y tipo de muestra

La vigilancia pasiva consistió en la recopilación rutinaria de información sobre la incidencia de la enfermedad a partir de diferentes fuentes y en diferentes niveles. En nuestro caso, los apicultores y veterinarios de campo pertenecientes a las diferentes asociaciones de apicultores o a la administración pública (Oficinas Comarcales Agrarias) remitieron muestras al laboratorio del Centro Apícola Regional de forma voluntaria. Las muestras se recogían cuando se detectó algún problema sanitario en las colmenas o como análisis rutinario del estado de la explotación. La toma de muestras se llevó a cabo durante los años 2010 y 2011 en paralelo con el estudio de la vigilancia activa.

Las muestras enviadas por los apicultores en su mayoría fueron abejas adultas o panales de cría. Debido a que de estas muestras se recibieron un número de abejas en cantidad muy variable se establecieron procedimientos de trabajo en el laboratorio para que todas las muestras recibidas fueran procesadas de la misma manera.

En este tipo de vigilancia no se realizó el análisis de productos agrotóxicos.

6.2. Recepción y organización de las muestras

Cuando una muestra llegaba al laboratorio se identificaba con un código alfanumérico correlativo y se anotaba en un libro de registro, junto con las posibles incidencias que pudieran surgir, del mismo modo que se hizo con las muestras de la vigilancia activa.

Las muestras que contenían abejas vivas se congelaron a -20°C y en el caso de los panales de cría se guardó un trozo de dicho panal a -20°C y el resto fue incinerado.

6.3. Procesado de las muestras

Se llevó a cabo como se explicó en el apartado 5.3.2.1. con un par de modificaciones. En este caso se utilizaron 100 abejas en cada bolsa con filtro, y las abejas se maceraron en agua Mili-Q estéril. En estas muestras no se contempló el análisis de virus por lo que solo se utilizó el sedimento generado siguiendo el procedimiento antes explicado.

6.4. Detección de patógenos

6.4.1. Identificación de *Varroa destructor*

La presencia de este ácaro se detectó durante el examen macroscópico de las abejas adultas (apartado 5.3.1.1.).

6.4.2. Identificación de *Acarapis woodi*

Para su detección se empleó la técnica de PCR descrita anteriormente en el apartado 5.3.2.2.2 (Cepero y col., 2015a).

6.4.3. Identificación del género *Nosema*

El diagnóstico de *N. apis* y *N. ceranae* se realizó mediante la técnica de PCR multiplex descrita por Martín-Hernández y col. (2012) en el punto 5.3.2.3.1.

6.4.4. Identificación de neogregarinos y tripanosomátidos

La presencia de estos organismos se analizó según la técnica de PCR duplex desarrollada por Meeus y col. (2010), explicada en el apartado 5.3.2.4.1.

6.5. Análisis estadístico de los datos

En este apartado se describen los datos de prevalencia como proporciones de positividad a diferentes patógenos con sus correspondientes intervalos de confianza (95%) obtenidos mediante vigilancia pasiva durante los años 2010 y 2011. Los resultados de los estudios de laboratorio se realizaron con el fin de detectar de manera rápida y eficaz los posibles brotes de enfermedades o cambios en la salud de las abejas melíferas.

Para el estudio de los resultados de las muestras de vigilancia pasiva no se incluyó el análisis de prevalencia de las enfermedades de la cría debido al reducido tamaño muestral. Tampoco se realizó un análisis de los virus puesto que se empleó un protocolo diferente para el tratamiento de las muestras que no permitió la adecuada conservación del ARN.

RESULTADOS



7. Capítulo 1: VIGILANCIA ACTIVA

7.1. Material de muestreo

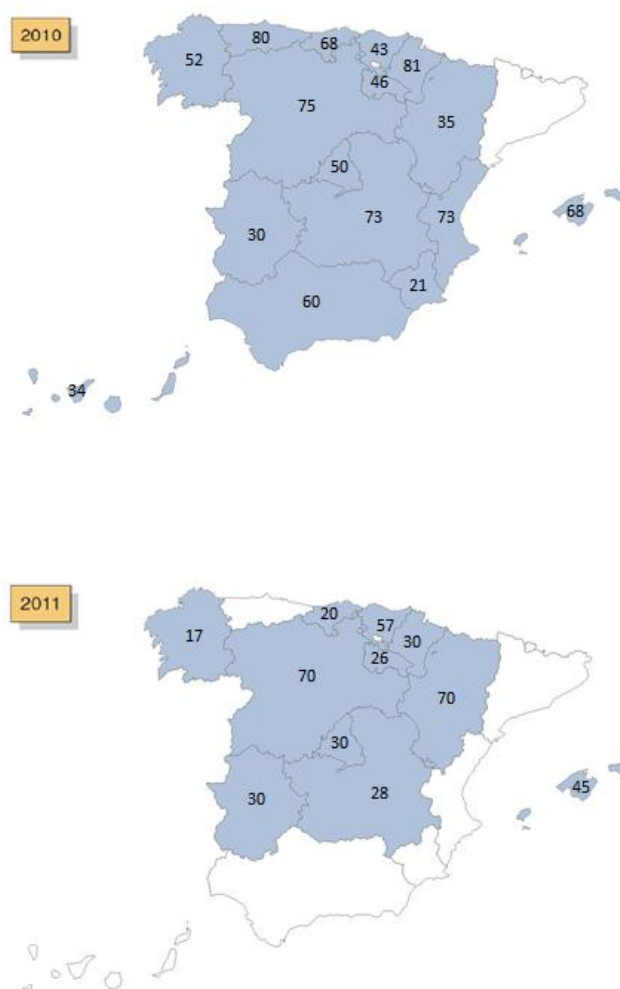
El número de colmenares a muestrear por Comunidad Autónoma para realizar un estudio a escala nacional se calculó en base a la prevalencia para *V. destructor* en la primavera del año 2007 (Tabla 10) determinada en el Tesis Doctoral de Garrido-Bailón (2012). Únicamente en las comunidades de Castilla-León y Madrid se alcanzó el número previsto previamente. Por ello el análisis de los datos se realizó a escala nacional, ya que en este caso en ambos años de muestreo se superó la cantidad mínima de 245 muestras requerida para obtener datos estadísticamente significativos. En la tabla 10 figura el número de colmenares a muestrear cada año en las distintas Comunidades Autónomas y la cantidad mínima recomendable para realizar un estudio regional y, por otro lado, la respuesta de los apicultores representada como el número de muestras de cada Comunidad Autónoma que se recibieron en el laboratorio para su análisis.

Tabla 10.- Cantidad de muestras recibidas con respecto a la cantidad mínima estimada para detectar prevalencia de los distintos patógenos de estudio tanto a nivel regional como nacional

Comunidad Autónoma	Mínimo para estudio regional	Nº muestras recibidas	
		2010	2011
Andalucía	60	-	-
Aragón	91	29	35
Asturias	18	-	3
Baleares	60	49	33
Canarias	67	13	-
Cantabria	68	28	6
Castilla La-Mancha	60	23	17
Castilla y León	60	68	63
Cataluña	69	-	-
Extremadura	29	3	16
Galicia	52	23	5
La Rioja	46	22	-
Madrid	39	39	38
Murcia	47	8	-
Navarra	81	34	34
País Vasco	84	21	25
Valencia	80	-	-
Total óptimo	815	360	275
Sin estratificar por CCAA	71	245	245

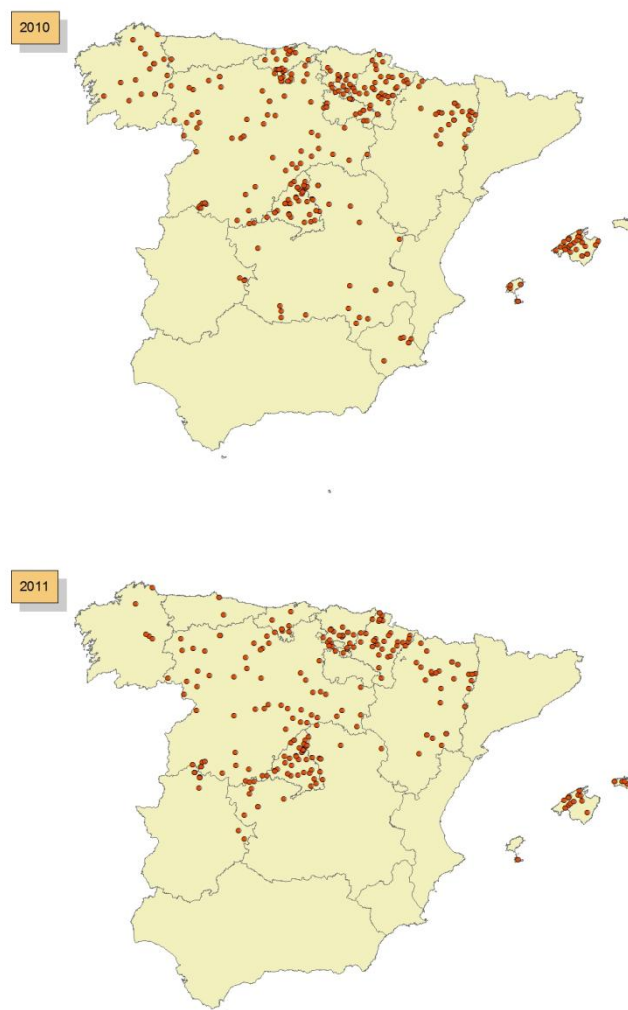
Se solicitaron un total de 889 muestras en 2010 y 423 en 2011 (Fig 5a). La reducción en el número de muestras solicitadas en 2011 se debió al bajo compromiso de participación.

Figura 5a. – Distribución del número de muestras solicitadas en 2010 (n = 889) y 2011 (n = 423) por cada Comunidad Autónoma



El material de muestreo se preparó en el CAR y se entregó a los apicultores por medio de la colaboración de las diferentes asociaciones de apicultores. Aquellos propietarios de explotaciones apícolas que decidieron participar en este estudio enviaron sus muestras al laboratorio de patología apícola del CAR. Las muestras recibidas en nuestras instalaciones procedieron de un total de 635 explotaciones apícolas a lo largo de ambos muestreos. Durante el año 2010 se recibió un total de 360 muestras de explotaciones apícolas, mientras que en el año 2011 se recibieron un total de 275 muestras distribuidas por el territorio nacional (Fig 5b).

Figura 5b.- Distribución del número de muestras recibidas en 2010 (n = 360) y 2011 (n = 275) a nivel de Comunidad Autónoma

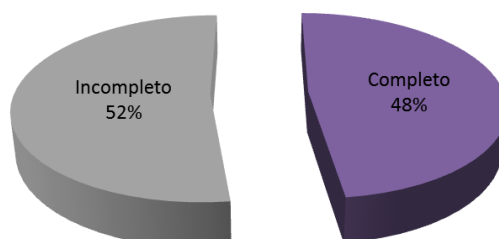


Desafortunadamente, no se consiguió participación en las Comunidades Autónomas de Andalucía, Valencia y Cataluña en ninguno de los muestreos. En otras Comunidades como es el caso de Asturias, La Rioja, Murcia y Canarias, colaboraron en al menos uno de los muestreos. Es importante destacar la existencia de algunas comunidades en las que el número de muestras recibidas fue menor de diez, como es el caso de Extremadura y Murcia en 2010, y Asturias, Cantabria y Galicia en 2011, lo cual se refleja con grandes variaciones al analizar los resultados. Por otro lado, pudo notarse una disminución del nivel de participación de un año en comparación con el siguiente, aunque, como se ha comentado anteriormente, el número total de explotaciones apícolas muestreadas fue representativo a escala nacional en ambos muestreos ya que superaron el valor mínimo requerido (245).

Sin embargo, al inventariar las muestras recibidas en el laboratorio se observó que aproximadamente la mitad de las muestras no contenían todo el material que se

había requerido (Fig 6), bien porque faltase alguno de los tipos de muestras solicitadas (miel, cera, fondo de colmena, abejas adultas y cría, etc) o bien porque no estaban las seis submuestras requeridas de diferentes colmenas de abejas adultas o cría.

Figura 6.- Porcentaje de muestras recibidas de forma completa e incompleta a lo largo de todo el estudio

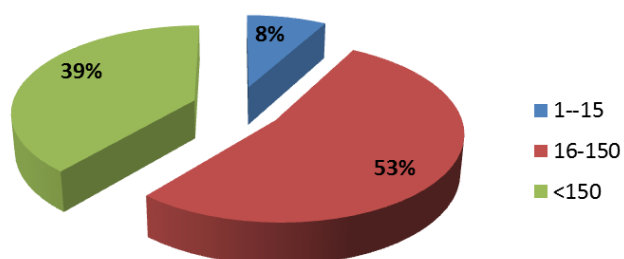


7.2. Encuesta epidemiológica

7.2.1. Cuestiones zootécnicas

El tamaño de los colmenares participantes se clasificó en 3 niveles según el número de colmenas (Fig 7): de 1 a 15 (autoconsumo), de 16 a 150 (no profesional) y más de 150 (profesional), según se indica en el RD 448/2005.

Figura 7.- Tipo de explotación según el número de colmenas

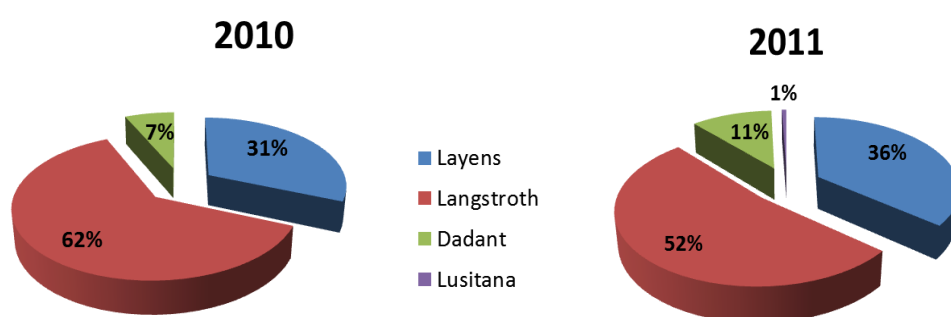


Aproximadamente la mitad de los apicultores que colaboraron en el estudio (53%) tenían colmenares compuestos por 16 a 150 colmenas considerándose por tanto, apicultores no profesionales. Alrededor de un 40% de los apicultores se dedicaban a la apicultura de manera profesional y los apicultores no profesionales que realizaban una apicultura de autoconsumo constituyeron una minoría (8%) con menos de 16 colmenas por apiario (Fig. 7).

La participación por tipo de explotación fue muy similar en los dos años de muestreo ($p>0,05$). Los apicultores “no profesionales” que participaron en este estudio se localizaron principalmente en Galicia, Cantabria, País Vasco y Asturias. En cambio, aquellos apicultores con un número de colmenas superior a 150, denominados “profesionales” se encontraron mayoritariamente en Extremadura, Castilla-La Mancha y Aragón.

Con respecto al tipo de colmena más utilizado por los apicultores participantes los resultados fueron similares los dos años de estudio, siendo la colmena Langstroth tipo perfección la más habitual, seguido del tipo Layens y Dadant (Fig 8).

Figura 8.- Tipo de colmena empleado por los apicultores participantes durante los dos años de estudio



La práctica de la trashumancia se realizó en un 29,7% de los casos durante el año 2010 y un 33,6% en el 2011. De los apicultores que sí realizaron trashumancia, tanto en el 2010 (107) como en el 2011 (91), alrededor del 75% eran profesionales.

7.2.2. Cuestionario sobre pérdida de colmenas y despoblamiento

En la encuesta se incluyeron una serie de preguntas establecidas por el Grupo COLOSS (Grupo de trabajo: “*Monitoring bee losses*”) para determinar la pérdida de colmenas y establecer relación, si la hubiera, con el síndrome de despoblamiento de las colmenas. Las cuestiones en 2010 y 2011 fueron ligeramente distintas para adaptarse al modelo del COLOSS de cada año.

Los apicultores declararon una pérdida total de 17.205 colonias de abejas lo que supone un 22,6% de las muertas en el año 2010 (moda=50%) y un 14,5% en 2011 (moda= 11,1%), que afectó al 66% de las explotaciones muestreadas (Tabla 11). De todas las explotaciones apícolas que mostraron una reducción en el número de colonias de abejas, alrededor del 63% de los casos declararon observar problemas de despoblamiento, sin embargo se optó por obviar el dato de colonias perdidas por despoblamiento debido a la gran subjetividad asociada a la hora de diferenciar una

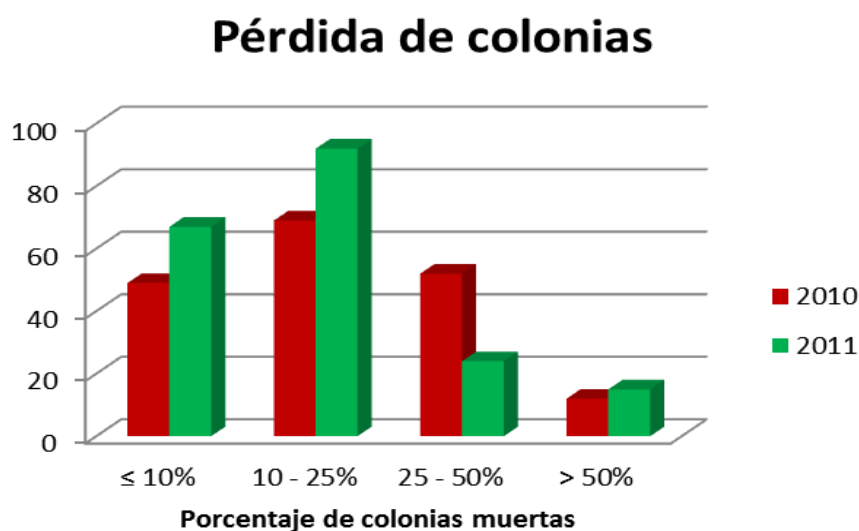
colmena débil de aquella que realmente padece un despoblamiento progresivo de la colonia sin el empleo de alguna técnica que lo confirme.

Tabla 11.- Proporción de apicultores que declararon pérdida de colonias de abejas y problemas de despoblamiento en sus explotaciones apícolas

		Explotaciones afectadas		Colonias perdidas		
		%	Total	n	Media (%)	Moda (%)
Pérdida de colonias	2010	50,7	66,16	9.275	22,6	50
	2011	89,5		7.930	14,5	11,1
Despoblamiento	2010	62,12	63,65	-	-	-
	2011	65,97		-	-	-

Tradicionalmente el 10% de pérdidas de colonias de abejas es una cantidad admitida de forma habitual dentro de una explotación apícola. Por ello, se consideró pérdidas no aceptables cuando la cantidad de colonias muertas superó dicho porcentaje. En la gráfica siguiente (Fig 9), se observa como la mayoría de explotaciones presentaron un porcentaje de pérdidas comprendido entre el 10 y 25% a lo largo de los dos años de estudio.

Figura 9.- Porcentaje de colonias muertas en las explotaciones apícolas los años 2010 y 2011



Posteriormente se determinó si existían relaciones epidemiológicas significativas, entre la elevada mortalidad de colonias de abejas y la presencia de algunos de los agentes nosógenos detectados. Estos resultados aparecen recogidos en el apartado 7.3.1.4.

7.2.3. Tratamientos realizados frente a *Varroa destructor*

En la encuesta se realizaron algunas preguntas relacionadas con los tratamientos para el control de varroa, ya que el tratamiento es obligatorio según el RD 608/2006, entre los meses de septiembre y noviembre. Pudimos observar que durante los años 2010 y 2011, aproximadamente el 96% de los apicultores declararon realizar al menos un tratamiento frente a *V. destructor*, por el contrario un 3% incumple la ley según el RD 608/2006 que obliga a realizar al menos un tratamiento al año (Fig 10) y otro 1% de los encuestados no contestaron esta pregunta. El 51% de los apicultores realizaron un tratamiento al año, mientras que el 44% de los encuestados declararon realizar dos tratamientos al año y tan solo un 1% afirmaron haber realizado un tercer tratamiento al año; al analizar estadísticamente estos datos entre años no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2 = 1.03$; $p > 0,05$).

Figura 10.- Proporción de apicultores que manifiesta realizar, o no, algún tratamiento al año frente a *V. destructor*



7.2.3.1. Primer tratamiento

A la hora de tratar las colmenas frente al ácaro varroa los apicultores disponen de una amplia variedad de materias activas. Los medicamentos veterinarios registrados pueden ser acaricidas tradicionales de síntesis o sustancias naturales empleadas en apicultura ecológica. Según queda recogido en la encuesta, los acaricidas más empleados por los apicultores fueron los tradicionales de síntesis como fluvalinato, cumafós, amitraz o flumetrina (Fig 11) y dentro de ellos, el medicamento más elegido frecuentemente en este estudio fue Apivar® (materia activa amitraz) en ambos muestreos, seguido por Apistan® (materia activa fluavilinato), CheckMite+® (materia activa cumafós) y Bayvarol® (materia activa flumetrina)(Tabla 12).

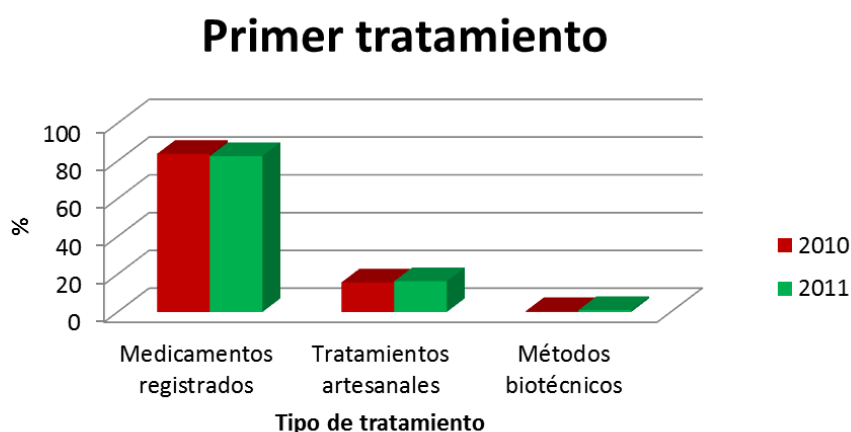
Como se ha comentado previamente, también existen tratamientos compatibles con la apicultura ecológica, entre los cuales se encuentran el Apiguard® (a

base de timol), que fue el más utilizado por los apicultores, frente al Ecoxal® (con ácido oxálico como principio activo).

A pesar de la gran variedad de productos acaricidas registrados en el mercado para controlar la varroosis, los apicultores declararon el uso de numerosas sustancias no registradas para uso apícola y por lo tanto prohibidas en esta especie. Estas sustancias se aplican como tratamientos artesanales y su uso incumple el RD 608/2006. Según las encuestas, en el año 2010 un 7,6% (Fig 11) de los apicultores emplearon otras sustancias prohibidas, dentro de las que se incluyen: ácido fórmico, amitraz de uso agrícola, Apicariol®, ApiLifeVar®, Hive clean®, cordón con vaselina-cera y miel, mezcla de humo de tabaco-romero-ajo, Klartán®, mentol, o Supona®. Mientras que durante el 2011 un 8,3% (Fig 11) de los apicultores realizaron tratamientos artesanales con: ácido fórmico, amitraz de uso agrícola, ApiLifeVar®, Hive clean®, hojas de menta, Klartán®, sustancias orgánicas, tabaco y vaselina con planta de ruda y metronidazol con azúcar. De todas estas sustancias no registradas las más empleadas fueron amitraz y mentol en 2010, y Hive clean® y Klartán® en 2011.

Un pequeño porcentaje de apicultores (0,5% en 2010 y 1,4% en 2011) utilizó cuadros con cera para zánganos como método biotécnico para el control de *V. destructor* (Fig 11), cuyo uso sí está permitido en el RD.

Figura 11.- Porcentaje de tipos de tratamientos utilizados por los apicultores participantes en este estudio para la realización del primer tratamiento contra la varroosis



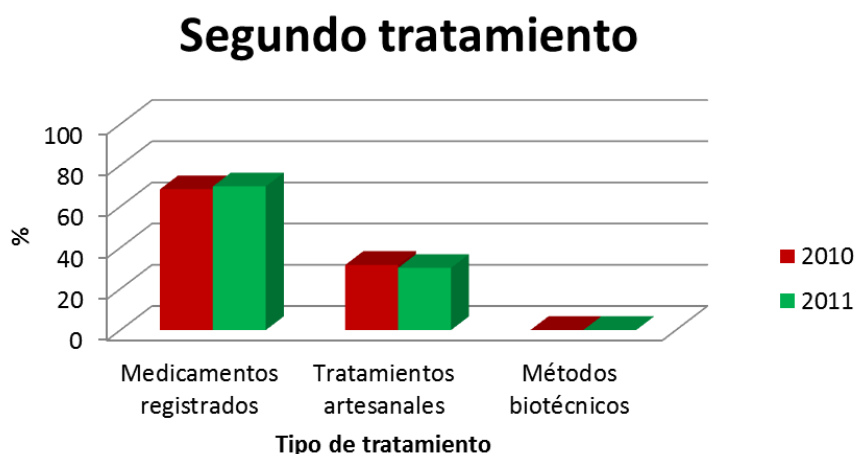
7.2.3.2. Segundo tratamiento

Para el segundo tratamiento, la mayoría de los apicultores manifestaron emplear medicamentos veterinarios registrados (Fig 12). Como en el primer tratamiento, se mantuvo el mismo orden de preferencias ya que predominaron los acaricidas tradicionales de síntesis con respecto a las materias activas compatibles con la apicultura ecológica. No se detectaron diferencias significativas en la variación de estas proporciones (medicamentos veterinarios, $\chi^2 = 0,08$, $p > 0,05$; tratamientos

compatibles con apicultura ecológica, $\chi^2 = 0,84$, $p > 0,05$). Del mismo modo que en el primer tratamiento, en este caso el acaricida más utilizado fue Apivar® durante los dos años de estudio, respecto al Bayvarol® que de nuevo fue el menos elegido por los apicultores para tratar sus colmenas. También se empleó más el Apiguard® que el Ecoxal®. La única diferencia con respecto al tratamiento anterior, fue que en el segundo tratamiento se observó un ligero aumento en la utilización de los medicamentos compatibles con la apicultura ecológica (Tabla 12).

En cuanto al empleo por parte de los apicultores de otros tratamientos artesanales, nuevamente el timol fue el producto más utilizado durante ambos años al compararlo con la utilización del ácido oxálico de forma minoritaria por parte de los propietarios de las explotaciones apícolas como se puede observar en la tabla 12, aunque tanto en el primer muestreo como en el segundo se siguió declarando el empleo de otras sustancias no registradas para tratar las colmenas contra la varroosis de forma artesanal (Fig 12 y Tabla 12). Durante el segundo tratamiento en 2010 el 5% de ellos declaró emplear alguna de las siguientes sustancias no registradas: ácido fórmico, amitraz (Furetto), Apicariol®, ApiLifeVar®, bandeja con vaselina-miel-cera, Hive clean®, cordón de algodón con vaselina-cera-miel, y Klartán® siendo ésta última la más empleada. Mientras que en 2011 el 6,9 % utilizó: ácido fórmico, amitraz (Furetto), Apitamol®, Hive clean®, hojas de menta, Klartán®, Metronidazol con azúcar o Supona®; de todos ellos el más utilizado fue Hive clean®.

Figura 12.- Porcentaje de tipos de tratamientos utilizados por los apicultores participantes en este estudio para la realización del segundo tratamiento contra la varroosis



En este caso, ninguno de los apicultores encuestados declaró el uso de cuadros de cera para zánganos como método de control de *V. destructor* en el segundo tratamiento.

Tabla 12.- Proporción de los distintos métodos de control empleados para el primer y segundo tratamiento frente a *V. destructor*, según manifiestan los apicultores

Métodos de control		2010		2011	
		1º tto (%)	2º tto (%)	1º tto (%)	2º tto (%)
*Medicamentos veterinarios registrados	Apistan®	21	26	28	21
	Bayvarol®	6	5	3	2
	Apivar®	45	37	40	47
	CheckMite+®	19	14	21	16
	Apiguard®	7	13	5	10
	Ecoxal®	2	5	3	4
Total		90	37	86	35
*Tratamientos artesanales	Timol	61	57	38	45
	Ácido oxálico	11	16	17	14
	Otros	28	27	45	41
	Total	17	17	17	15

*Calculados en base al 100%

7.2.3.3. Aplicación de los tratamientos

Los apicultores que realizaron algún tratamiento frente a *V. destructor* con alguno de los medicamentos veterinarios, contestaron a las preguntas sobre el producto empleado, el número de tiras que habían aplicado en las colmenas y la duración en semanas del primer y segundo tratamiento. En base a estas respuestas se construyeron las variables “primer tratamiento” y “segundo tratamiento” que se clasificaron en correcto o incorrecto de acuerdo con los parámetros de la Tabla 13:

Tabla 13.- Criterios considerados como tratamientos correctos

Medicamento veterinario (principio activo)	Nº de tiras correcto	Nº semanas óptimo
Apivar® (Amitraz)	2	8 a 10
Apistan® (Fluvalinato)	2	4 a 6
CheckMite+® (Coumafós)	2	4 a 6
Bayvarol® (Flumetrina)	4	6

Atendiendo a estos criterios solo el 33,1% de los apicultores en el año 2010 y el 27,3% en el 2011, realizaron el primer tratamiento de forma adecuada.

Tras analizar la asociación entre el tipo de apicultor y la realización correcta o incorrecta del primer tratamiento, se observó que ambos años de estudio, la proporción de apicultores no profesionales y profesionales que realizaron este primer tratamiento correctamente fue similar (2010: $\chi^2=0,8$ $p>0,05$; 2011: $\chi^2=0,77$ $p>0,05$). Es decir, apicultores profesionales y no profesionales realizaron los tratamientos de forma correcta o incorrecta en igual medida.

El segundo tratamiento fue realizado de forma adecuada por tan solo el 15,3% de los apicultores a lo largo de los dos años que duró el estudio. Al igual que sucedió en el primer tratamiento, tanto los apicultores profesionales como los no profesionales realizaron este segundo tratamiento de forma correcta o incorrecta en la misma medida (2010: $\chi^2=0,45$; $p>0,05$), (2011: $\chi^2=1,05$; $p>0,05$) y no se apreciaron cambios significativos de un año a otro ($\chi^2=0,001$, $p>0,05$).

Es destacable el elevado porcentaje de apicultores profesionales (85%) que realizaron de manera incorrecta el tratamiento obligatorio para el control de la varroosis lo cual supone un importante riesgo sanitario. A su vez no se apreciaron cambios significativos en la manera de aplicar los tratamientos entre los apicultores profesionales y los no profesionales de un año a otro ($\chi^2=0,846$, $p>0,05$).

7.3. Detección de agentes nosógenos

7.3.1. Detección de patógenos

En este apartado se describen los resultados de detección de agentes patógenos y por tanto, la prevalencia estimada de los mismos obtenidos mediante el sistema de vigilancia activa impuesto en nuestro laboratorio durante los años 2010 y 2011, utilizando el número de muestras recibidas cada año. Los valores de prevalencia estimada para cada patógeno se expresan como porcentajes de positivos sobre el total de muestra analizado con el correspondiente intervalo de confianza del 95% de una hipotética inferencia poblacional.

7.3.1.1. Examen Macroscópico

7.3.1.1.1. *Varroa destructor*

Un colmenar se consideró positivo cuando al menos una de las seis muestras de abejas adultas o de cría recibidas, y pertenecientes a colonias de abejas diferentes, eran positivas. La prevalencia media anual estimada fue 48,9% en 2010 y 64% en 2011 (Tabla 14). El dato de prevalencia anual estimada mostró un incremento significativo en 2011 ($\chi^2=13,81$; $p<0,05$).

Tabla 14.- Prevalencias anuales de *Varroa destructor*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	48,9	43,6	54,2
2011	64	58,1	69,9

De forma individual, la prevalencia de varroa calculada en las muestras de abejas adultas (45% en 2010 y 52,4% en 2011) fue mayor que en la cría (16,1% en 2010 y 39,6% en 2011).

Respecto al porcentaje de parasitación total en las muestras positivas, a lo largo de todo el estudio, se detectaron niveles muy bajos de parasitación, siendo inferiores al 1% en todas las muestras analizadas, con la excepción de las muestras procedentes de Navarra que presentaron un valor de 1,5% en el año 2011. El porcentaje de parasitación máximo fue también bajo con un rango que oscilaba entre el 0,1%, en las muestras que proceden de Madrid y Extremadura, y el 3,6%, detectado en las muestras procedentes de Cantabria en 2011. Por último, el promedio del porcentaje de parasitación mínimo en el año 2010 presentó valores muy reducidos que no superaban el 1%, salvo en las muestras procedentes de Aragón y Galicia, mientras que en 2011 solamente se obtuvo el valor de 0,2% en las muestras procedentes de Castilla y León.

Presencia de ácaros según la realización del tratamiento (encuesta)

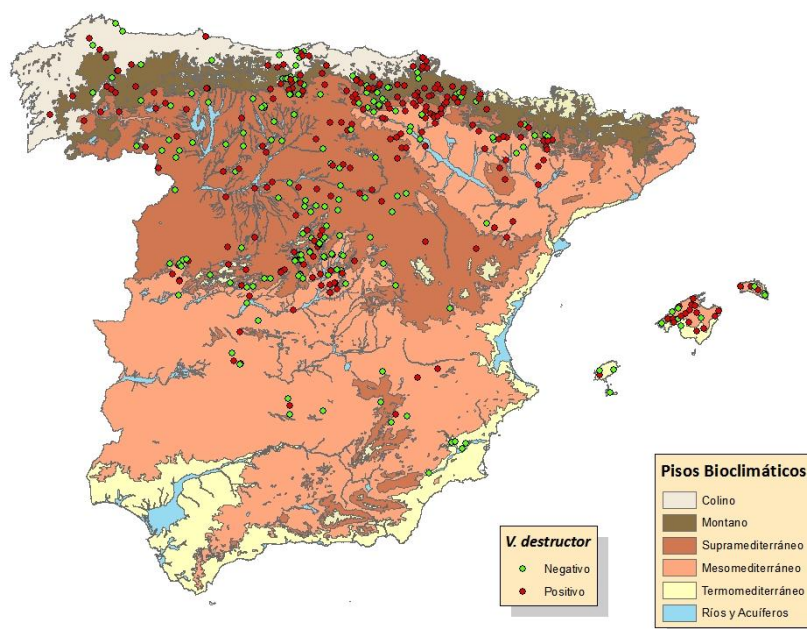
Se estudió la correlación entre los distintos porcentajes de parasitación (total, máximo y mínimo) y la realización del primer tratamiento de forma correcta o incorrecta. En ambos años de muestreo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $p>0,05$) entre los apicultores que realizaron correctamente el tratamiento y aquellos que lo aplicaron de manera incorrecta. El hecho de que tanto las colmenas tratadas correctamente como las que se tratan de forma incorrecta presenten los mismos niveles de parasitación sugiere la posibilidad de que los apicultores estén realizando tratamientos adicionales, probablemente artesanales, que no describen en la encuesta realizada.

Tampoco la realización del segundo tratamiento de manera correcta o incorrecta tuvo repercusión sobre el resultado frente al porcentaje de parasitación de varroa en ninguno de los dos años de estudio, lo que refuerza la hipótesis anterior.

Respecto a si la realización correcta o incorrecta de los tratamientos tuvo alguna repercusión sobre la positividad de *V. destructor* en las muestras analizadas, no se observaron diferencias significativas en los siguientes casos estudiados. En primer lugar, se encontró un porcentaje similar de muestras positivas y negativas a *V. destructor* entre los apicultores que declararon realizar correctamente el primer tratamiento (χ^2 2010=0,9385; $p>0,05$ y χ^2 2011=2,96; $p>0,05$). En segundo lugar, la proporción de resultados positivos y negativos a *V. destructor* también fue muy parecida entre los apicultores que habían realizado el segundo tratamiento de forma correcta (χ^2 2010=0,01; $p>0,05$ y χ^2 2011=0,14; $p>0,05$). En tercer lugar, a pesar de que ambos años los resultados positivos al ácaro fueron mayores (63% aprox.) entre aquellos apicultores que realizaron de forma correcta los dos tratamientos, en ningún caso alcanzaron significación estadística ante la positividad a *V. destructor* (χ^2 2010=1,81; $p>0,05$ y χ^2 2011=0,008; $p>0,05$).

Otro factor que se estudió fue si el tipo de colmena podía influir sobre la presencia de este patógeno. No se observó ninguna relación entre el tipo de colmena utilizado y los distintos porcentajes de parasitación (χ^2 , $p>0,05$) ni tampoco con la cantidad de muestras positivas al ácaro ($\chi^2=1,07$; $p>0,05$ en 2010; $\chi^2=1,37$, $p>0,05$ en 2011). En este estudio solo se incluyeron las colmenas de tipo Langstroth y Layens por ser las más habitualmente empleadas por los apicultores.

Figura 13.- Distribución espacial del número de muestras de *V. destructor* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al analizar la distribución de *V. destructor* durante los dos años de estudio de manera conjunta no se encontraron diferencias significativas entre ningún piso

climático, por lo que se podría considerar que presenta una distribución homogénea con altas prevalencias en todos los pisos bioclimáticos (Fig 13 y Tabla 15).

Tabla 15.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *V.destructor* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>V. destructor</i>	N	%	χ^2	p
Supramediterráneo (G)	181	40,9	-	-
Mesomediterráneo (H)	197	49,2	2,33	0,1268
Colino (D)	34	52,9	1,24	0,2649
Montano (C)	96	53,1	3,32	0,0685
Termomediterráneo (I)	26	57,7	1,98	0,1594

7.3.1.1.2. Otros ectoparásitos

En ninguna de las explotaciones sometidas a estudio durante los años 2010 y 2011 se encontraron ni ácaros del género *Tropilaelaps spp.* ni el díptero *Braula coeca* durante el análisis macroscópico de las muestras.

7.3.1.2. Prevalencia de patógenos detectados mediante diagnóstico molecular

7.3.1.2.1. *Acarapis woodi*

7.3.1.2.1.1. Nuevas aportaciones

En este trabajo se diseñaron nuevos cebadores para la detección molecular mediante la técnica de PCR de este ácaro endoparásito. Estos amplificaron un fragmento de 180 pb del gen COI mitocondrial de *Acarapis woodi* (Tabla 16).

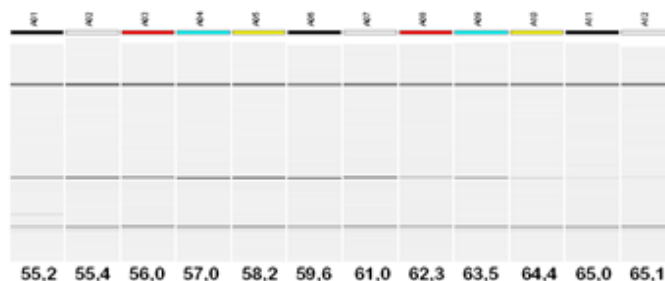
Tabla 16.- Secuencia de la pareja de cebadores diseñados en este estudio y tamaño del fragmento amplificado

Cebador	Secuencia 5'-3'	Amplicón
AW180-F	<u>G</u> GAAATATGATCTGGTTTAGTTGGTC	180 pb
AW180-R	<u>G</u> AATCAATTTCCAAACCCACCAATC	

Con el fin de aumentar la temperatura de anillamiento se añadió una guanina a cada uno de ellos en el extremo 5' (subrayadas en la Tabla 16). Posteriormente, se realizaron pruebas para determinar cual era la mejor temperatura de anillamiento de la pareja de cebadores. Para ello se realizó una PCR en gradiente de temperaturas. El rango de temperatura óptimo de los cebadores fue entre 57 y 61°C (Fig 14). Se

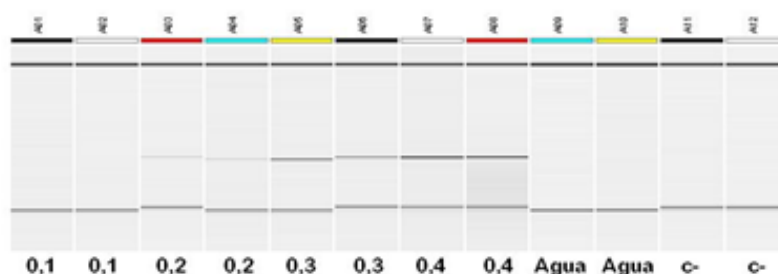
seleccionó 59°C como temperatura que permitiera reducir el rango de amplificaciones inespecíficas y mantuviese un buen nivel de sensibilidad.

Figura 14.- Gradiente de temperaturas para los cebadores AW-180



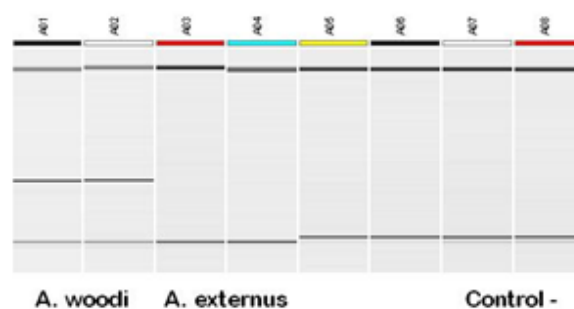
Con el fin de establecer la concentración óptima de los cebadores en la reacción de PCR, se realizó esta técnica utilizando un gradiente de concentraciones de los citados cebadores entre 0,1 y 0,4 μM . Los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 0,4 μM (Fig 15), en las que se observó amplificación del tamaño esperado (180 pb) en la posterior electroforesis. Por consiguiente, esta temperatura y concentración de cebador se seleccionaron para los análisis posteriores.

Figura 15.- Gradiente de temperaturas realizado para los cebadores AW-180



La reproducibilidad de la técnica se evaluó mediante la repetición de todo el proceso 5 veces en 10 muestras, desde la extracción de ADN hasta el análisis electroforético de los productos de la PCR. En todos los casos se obtuvieron los mismos resultados para cada muestra, lo que confirmó la reproducibilidad del método. Además, se incluyeron abejas parasitadas por *A. woodi*, como controles positivos para la prueba de PCR desarrollada, procedentes de Irlanda y Estados Unidos y enviadas por distintos grupos de investigación. Estas muestras se analizaron siguiendo este protocolo, y se secuenciaron 4 productos de PCR que confirmaron que correspondían solo a *A. woodi*. Se comprobó igualmente la especificidad de la técnica, analizando muestras positivas a *Acarapis externus*, confirmando que los cebadores diseñados solo anillaban con *A. woodi* (Fig 16). Todo ello confirmó la especificidad, reproducibilidad y repetitividad de la técnica puesta a punto.

Figura 16.- Prueba de especificidad de los cebadores AW-180



Con el fin de poder igualar la sensibilidad de la técnica desarrollada en el presente estudio con las obtenidas anteriormente y poder comparar los resultados, se estableció el límite de detección para las dos parejas de cebadores (Garrido-Bailón y col., 2012 y los aquí diseñados – Cepero y col., 2015a) utilizando diluciones 1/5, 1/10, 1/15, 1/20 y 1/25 de ADN de un control positivo. La pareja de cebadores diseñada por Garrido-Bailón y col. (2012)(ACAR) fue capaz de detectar la dilución 1/10 pero los cebadores de este trabajo (AW-180) no pudieron detectar dicha dilución. Con el fin de igualar el nivel de sensibilidad de la técnica, lo que nos permitiría posteriormente comparar la prevalencia obtenida por nosotros con el estudio anterior, se testaron distintas cantidades de ADN molde (2,5 - 4 μ l). Al utilizar 4 μ l de muestra con los cebadores AW-180 se obtuvo la misma sensibilidad para ambas reacciones, por ello se seleccionó este volumen de ADN para todas las PCRs subsiguientes.

7.3.1.2.1.2. Análisis de diversidad genética entre aislados de *A. woodi*

Las secuencias obtenidas a lo largo de este estudio fueron depositadas en *GenBank* y sus correspondientes números de secuencia aparecen en la Tabla 17.

Tabla 17.- Tipos de muestras utilizadas en el análisis de divergencia

Muestra	Referencia	Referencia <i>GenBank</i>
Aislados	A9	HF945444
	E1	HF945445
	E2	HF945446
	F10	HF945447
Clones	Aislado E2 - 15 y 16	HG967529 y HG967530
	Aislado 1431 - 1,2,3,5,7,8,9,10,11,12,13,14,15,18,19,20,21,22	HG967531 - HG967548
	Aislado 1953 - 2,5,6,7,8,9,12	HG967549 - HG967555
	Aislado 595 - 10,11, 13,14,19	HG967556 - HG967560
	Aislado 595 - 23	HG967561
<i>GenBank</i>	Kojima y col., 2011*	AB634837*
		AB634838*
	Ward y col., 2010**	HQ162657**
		HQ162656**

Se seleccionaron cuatro muestras (A9, E1, E2 y F10) positivas a *A. woodi* por PCR; sus fragmentos amplificados se sometieron a secuenciación directa y las secuencias generadas se compararon con las secuencias de *A. woodi* disponibles en *GenBank* (Tabla 17), lo que permitió comprobar que tres de los cuatro aislados (A9, E1 y F10) mostraban secuencias idénticas a las referencias AB634837 y AB634838 de *GenBank*. Sin embargo, la muestra E2 presentaba ciertas diferencias con respecto a este grupo (8,34% de divergencia sinónima, Tabla 18), entre ellas, un doble pico para C y T en la posición 102 de AB634837 (considerado como la secuencia de referencia, Kojima y col., 2011b), lo que podría reflejar bien heteroplasma (presencia de más de un linaje mitocondrial en *A. woodi*) o bien una mezcla de secuencias de especies diferentes. Para solucionar esta cuestión se clonaron los fragmentos amplificados del aislado E2 y de otros tres aislados (595, 1431 y 1953) previamente diagnosticados como *A. woodi* mediante secuenciación directa de una región diferente del gen COI (Garrido-Bailón y col., 2012).

Tabla 18.- Divergencia sinónima por parejas entre las secuencias de *Acarapis woodi*, expresado como porcentaje

Muestra (Clon/es)	Kojima I	Kojima II	Ward I	Ward II	F10	E2	E1	A9	E2 (15)	E2 (16)	1431 (1-22)	1953 (2-12)	595 (10-19)	595 (23)
Kojima I														
Kojima II	0.00													
Ward I	2.66	2.66												
Ward II	2.66	2.66	0.00											
F10	0.00	0.00	2.66	2.66										
E2	8.34	8.34	11.34	11.34	8.34									
E1	0.00	0.00	2.66	2.66	0.00	8.34								
A9	0.00	0.00	2.66	2.66	0.00	8.34	0.00							
E2 (15)	8.34	8.34	11.34	11.34	8.34	0.00	8.34	8.34						
E2 (16)	11.18	11.18	14.26	14.26	11.18	2.67	11.18	11.18	2.67					
1431 (1-22)	11.34	11.34	14.47	14.47	11.34	2.70	11.34	11.34	2.70	5.43				
1953 (2-12)	11.34	11.34	14.47	14.47	11.34	2.70	11.34	11.34	2.70	5.43	5.51			
595 (10-19)	8.34	8.34	11.34	11.34	8.34	0.00	8.34	8.34	0.00	2.67	2.70	2.70		
595 (23)	0.00	0.00	2.66	2.66	0.00	8.34	0.00	0.00	8.34	11.18	11.34	11.34	8.34	

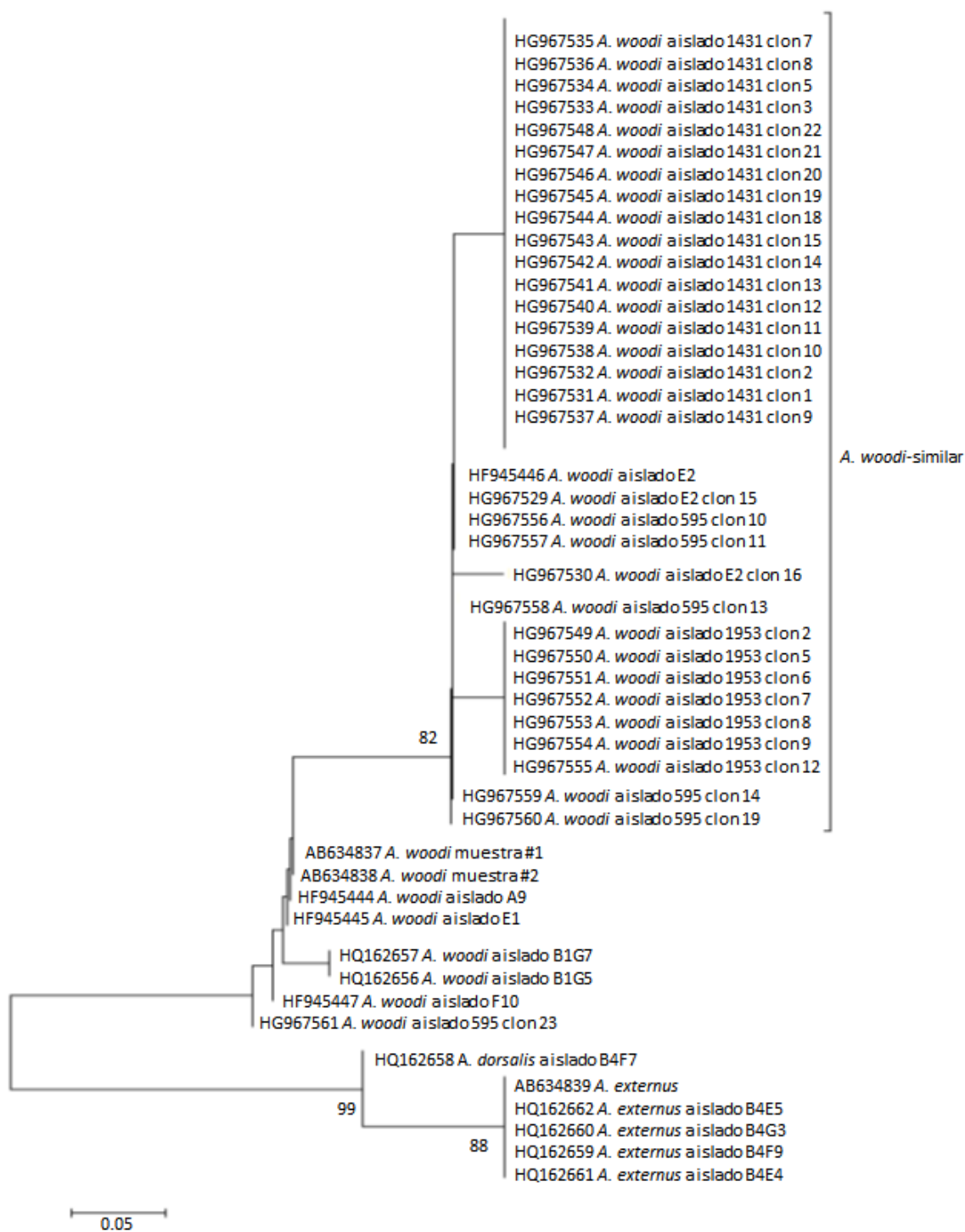
El color amarillo corresponde a las secuencias disponibles en *GenBank* utilizadas como referencia a la hora de realizar comparaciones (Kojima y Ward) y el verde representa las secuencias obtenidas en este trabajo, diferenciando los aislados en un tono más oscuro y las muestras sometidas a clonación en un tono más claro.

Los dos clones obtenidos a partir del aislado E2 (clones 15 y 16), aunque ligeramente distintos entre sí, reflejaron niveles de divergencia sinónima con respecto a AB634837, similares a los obtenidos por secuenciación directa (Tabla 18).

Por el contrario, el análisis de los clones de los otros aislados de *A. woodi* mostraron resultados inesperados. Sólo una secuencia del aislado 595 (clon 23) pudo ser agrupada dentro del clado "tradicional" de *A. woodi*, mientras que las otras cinco secuencias obtenidas a partir de esta muestra resultaron ser idénticas al clon 15 del aislado E2 (Tabla 18). Todas las secuencias de los aislados 1431 y 1953 se agruparon

dentro del grupo E2 (denominado en lo sucesivo *A. woodi*-similar) y, a diferencia de los clones E2 y 595, no mostraron variaciones (Tabla 18 y Figura 17).

Figura 17.- Filogenia *neighbor-joining* de las secuencias de *Acarapis* (lugares sinónimos)



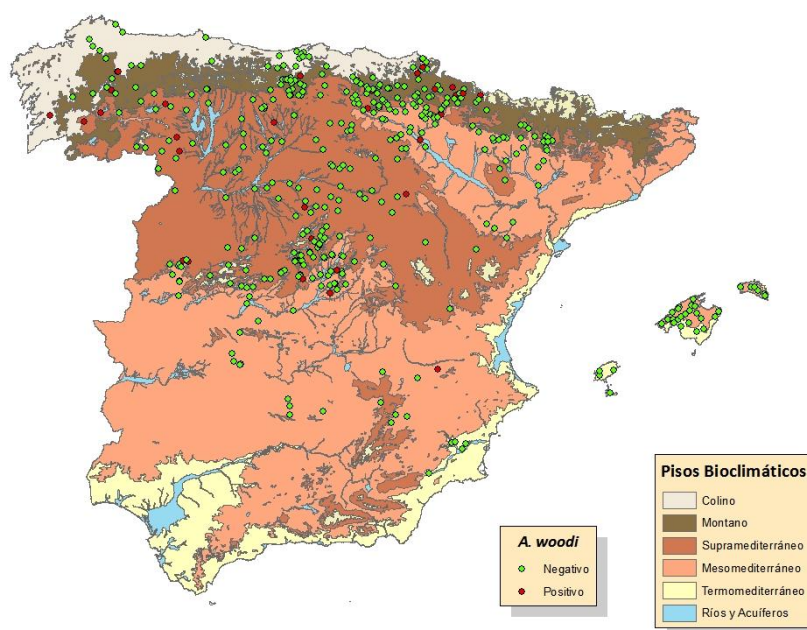
7.3.1.2.1.3. Prevalencia de *A. woodi*

En 2010 se obtuvo una prevalencia media del 8,3% a nivel nacional (Tabla 19). En 2011 la prevalencia de *A. woodi* fue 4%, lo que supuso un descenso estadísticamente significativo ($\chi^2=4,15$; $p<0,05$).

Tabla 19.- Prevalencias anuales de *Acarapis woodi*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	8,3	5,3	11,3
2011	4	1,5	6,5

Figura 18.- Distribución espacial del número de muestras de *A. woodi* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



La distribución de las muestras positivas a *A. woodi*, al agrupar ambos períodos de muestreo, mostró una tendencia a concentrarse en el piso montano, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos pisos climáticos. En este caso *A. woodi* se encuentra más asociado a las zonas más frías de España, mientras que no aparece en las zonas más cálidas (Fig 18). La ausencia del ácaro en estas zonas, podría estar influenciada por el reducido número de muestras procedentes del piso termomediterráneo (Tabla 20).

Tabla 20.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *A. woodi* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>A. woodi</i>	N	%	χ^2	<i>p</i>
Termomediterráneo (I)	26	0	-	-
Mesomediterráneo (H)	197	3,6	0,16*	0,6867
Colino (D)	34	5,9	0,07*	0,7947
Supramediterráneo (G)	181	6,1	0,04*	0,8493
Montano (C)	96	13,5	1,47*	0,2251

*Comparación con el piso I

7.3.1.2.2. Género *Nosema*

En este trabajo se introdujeron algunas modificaciones metodológicas con respecto a estudios anteriores. Para la detección de las dos especies de microsporidios se empleó la polimerasa *HotSplit*® (*Biotoools*) en premezclas gelificadas, que supone un ahorro en tiempo y la reducción del riesgo de contaminación de las muestras al disminuir el número de pipeteos necesarios para cargar los reactivos al realizar la técnica de PCR. Por ello, y para poder comparar los resultados de este estudio con otros anteriores (Garrido-Bailón, 2012), en los que se utilizó la misma técnica con distintas polimerasas, se hizo un estudio comparativo de la sensibilidad de las distintas enzimas (Tabla 21). Se comprobó que la enzima *HotSplit*® (*Biotoools*) resultó más sensible que la enzima *HighFidelity*® (Roche), mientras que presenta una sensibilidad similar a la enzima *FastStart PCR Master*® (*Roche Diagnostic*).

Tabla 21.- Sensibilidad y detección de esporas por PCR de distintas enzimas comerciales dependiendo del tipo de muestra de partida

Patógeno	Tipo muestra	<i>High Fidelity</i> ® (esporas/PCR) **	<i>FastStart</i> ® (esporas/PCR) ***	Δ Sensibilidad <i>High Fidelity</i> ® vs <i>FastStart</i> ®	<i>HotSplit</i> ®	
					esporas/PCR	Sensibilidad
<i>N. apis</i>	Macerado abejas	100	50-5	x2 - x20	25	En rango
	Purificado esporas*	2000	250	x8		
<i>N. ceranae</i>	Macerado	1000-500	2500-25	x2,5 - x20	25	En rango
	Purificado esporas*	500	2,5	x200		

* Percoll 95%

** Martín-Hernández y col., 2007

*** Martín-Hernández y col., 2012

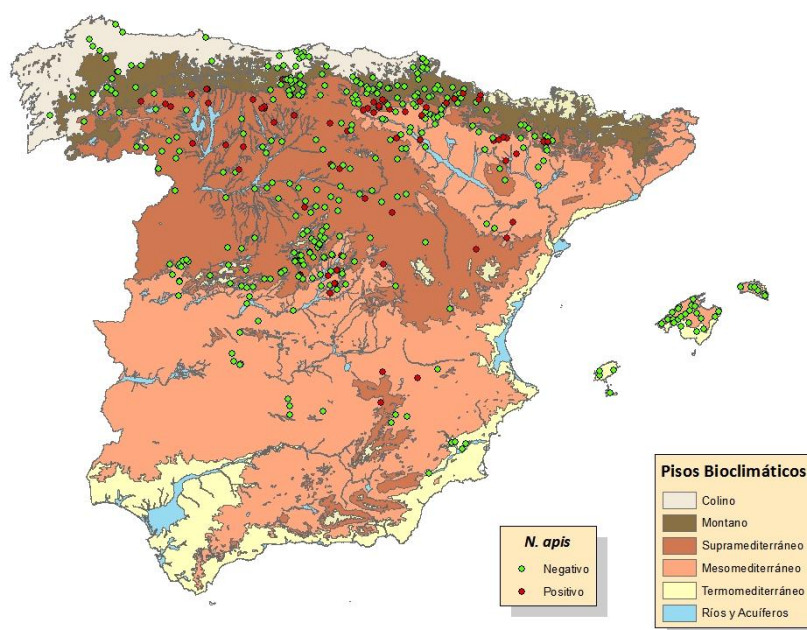
7.3.1.2.2.1. *Nosema apis*

La prevalencia media de *N. apis* fue igual entre los años estudiados (Tabla 22) sin diferencias significativas ($\chi^2=0,012$, $p>0,05$).

Tabla 22.- Prevalencias anuales de *N. apis*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	15,3	11,4	19,1
2011	15,3	10,8	19,7

Figura 19.- Distribución espacial del número de muestras de *N. apis* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al agrupar los dos años de estudio, la prevalencia de *N. apis* fue más alta en los pisos supramediterráneo y mesomediterráneo (Fig 19) habiendo además diferencias estadísticamente significativas entre estos dos pisos bioclimáticos (Tabla 23). La prevalencia en el piso montano, muy próxima a la observada en el mesomediterráneo, rozó la significación estadística (Tabla 23).

Tabla 23.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *N. apis* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>N. apis</i>	N	%	χ^2	p	χ^2	g.l
Colino (D)	34	0	-	-		
Termomediterráneo (I)	26	3,8	0,05*	0,8231		
Montano (C)	96	16,7	3,63*	0,0566	-	-
Mesomediterráneo (H)	197	16,8	3,86*	0,0495	-	-
Supramediterráneo (G)	181	17,7	4,24*	0,0395	0,07**	2

*Comparación con el primer nivel (D)

**Comparación de los tres últimos niveles (C,H y G)

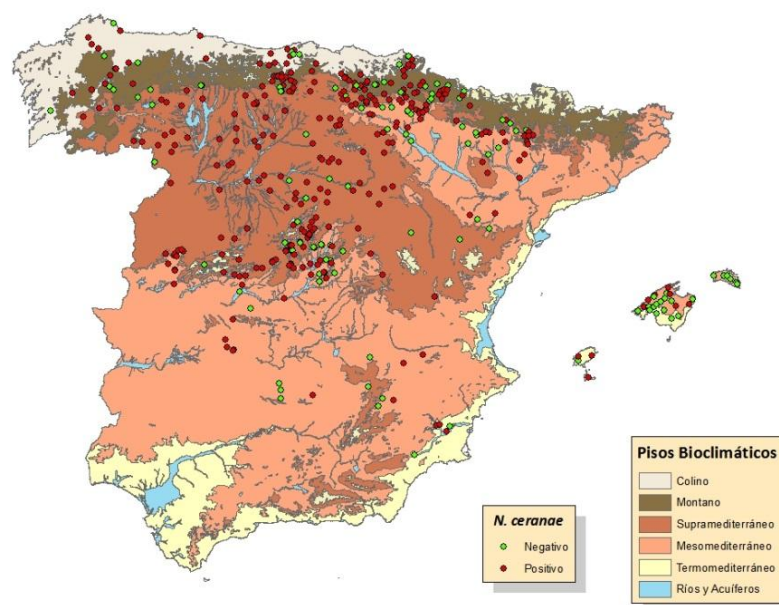
7.3.1.2.2.2. *Nosema ceranae*

La prevalencia media de *N. ceranae* fue muy similar entre los dos años de estudio (Tabla 24) con valores de 73,3 % en 2010 y 70,9 % para 2011 sin diferencias significativas entre ambos años ($\chi^2=0,344$; $p>0,05$). De hecho, este fue el patógeno con mayor prevalencia en el presente estudio.

Tabla 24.- Prevalencias anuales de *N. ceranae*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	73,3	68,6	78
2011	70,9	65,4	76,5

Figura 20.- Distribución espacial del número de muestras de *N. ceranae* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al juntar los dos años, este patógeno resultó ser de los más ubicuos encontrándose repartido por todos los pisos climáticos (Fig 20). Cabe destacar que la prevalencia de *N. ceranae* en el piso termomediterráneo fue muy baja mientras que el valor máximo se registró en el piso supramediterráneo, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos pisos (Tabla 25). Estos resultados no confirmarían la mayor prevalencia de este microsporidio en zonas con altas temperaturas, tal y como se ha descrito en estudios previos (Martín-Hernández y col., 2012), lo cual podría explicarse por el reducido número de muestras procedentes del piso termomediterráneo.

Tabla 25.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *N. ceranae* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>N. ceranae</i>	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2
Termomediterráneo (I)	26	57,7	-	-	
Colino (D)	34	70,6	0,58*	0,4445	-
Mesomediterráneo (H)	197	71,1	1,36*	0,2438	-
Montano (C)	96	77,1	2,98*	0,0844	-
Supramediterráneo (G)	181	80,7	5,68*	0,0172	5,28**

*Comparación con el primer piso (I)

**Comparación de los cuatro últimos pisos de forma conjunta

Por último, se calculó el porcentaje de muestras positivas a cada microsporidio de manera independiente y en coinfección. Se observó que la mayoría de muestras positivas a *N. apis* durante los dos años de muestreo aparecían en coinfección con *N. ceranae* (Tabla 26).

Tabla 26.- Número de muestras positivas a cada patógeno por separado y en coinfección

Patógeno	2010		2011	
	n	%	n	%
<i>N. apis</i>	12	4,4	10	4,9
<i>N. ceranae</i>	221	80	163	79,5
Coinfección	43	15,6	32	15,6

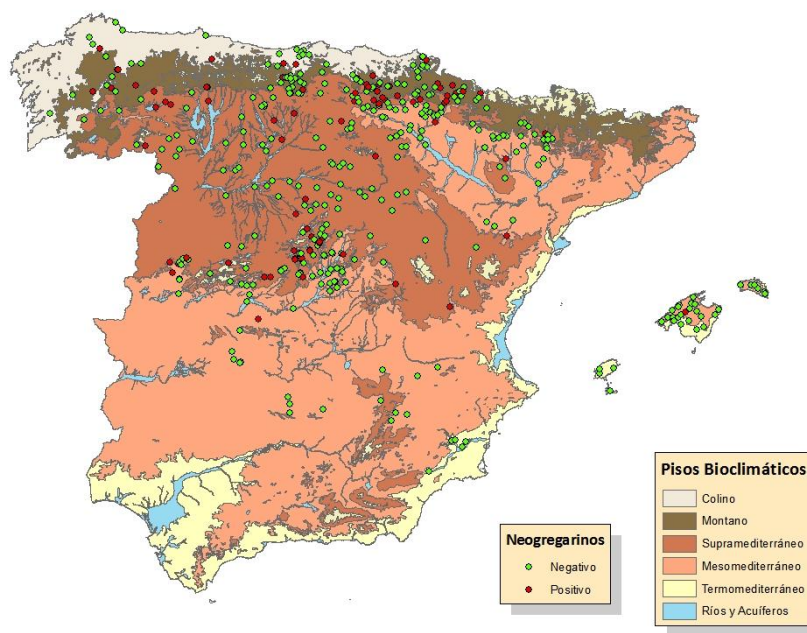
7.3.1.2.3. Neogregarinos

La prevalencia media anual de los neogregarinos fue ligeramente superior en 2011 que en 2010 (Tabla 27), aunque sin diferencias significativas entre ambos años de estudio ($\chi^2=1,38$; $p>0,05$).

Tabla 27.- Prevalencias anuales de los neogregarinos

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	15,6	11,7	19,4
2011	20	15,1	24,9

Figura 21.- Distribución espacial del número de muestras de neogregarinos según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Tras unificar ambos años de estudio, el grupo de los neogregarinos no se detectó en el piso termomediterráneo y su prevalencia fue baja en el mesomediterráneo, en comparación con otras zonas, aunque sin presentar diferencias significativas entre ellos. Su prevalencia se incrementó en el resto de pisos. Los pisos montano y supramediterráneo mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al piso termomediterráneo (Tabla 28). En general, la presencia de neogregarinos se encontró mayoritariamente asociada al piso montañoso durante los dos años de estudio (Fig 21).

Tabla 28.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de neogregarinos a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos Neogregarinos	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2	g.l
Termomediterráneo (I)	26	0	-	-		
Mesomediterráneo (H)	197	8,6	0,4	0,5387*		
Colino (D)	34	20,6	3,1	0,0773*	-	-
Supramediterráneo (G)	181	21	3,9	0,0487*	-	-
Montano (C)	96	32,3	8,1	0,0045*	4,627**	2

* Comparación con el piso I

** Comparación entre niveles D, G y C de forma conjunta

7.3.1.2.4. Tripanosomátidos

7.3.1.2.4.1. Análisis de diversidad genética

Las secuencias de los clones obtenidas en este estudio fueron depositadas en *GenBank* y sus códigos de acceso (KJ704218 - KJ704241) aparecen en la Tabla 29.

Tabla 29.- Resumen de los tipos de muestras utilizadas para hacer el análisis genético

Muestras	r DNA 18s		GAPDH	
	Clones	Código NCBI	Clones	Código NCBI
ATCC30254*	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	KJ704242-51	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	KJ704273-82
324	1,2,3,6,7,8,9,10	KJ704218-25	1,6,9	KJ704252-54
325	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	KJ704226-35	1,2,3,5,6,7,8,9,10	KJ704255-63
1980	4,6,7,8,9,10	KJ704236-41	2,3,4,5,6,7,8,9,10	KJ704264-72
<i>GenBank</i>	Muz, 2013	KF607064.1	Runckel y col., 2011	JF423199.1
	Yang y col., 2012	AB745488.1	Yang y col., 2012	AB745489.1
			Morimoto y col., 2013	AB716357.1

*Cepa de referencia

Las secuencias de los clones obtenidos para el locus *18S rDNA* en tres muestras positivas a tripanosomátidos (324, 325 y 1980) resultaron ser idénticas a las secuencias disponibles en *GenBank* para *C. mellificae* (KF607064.1 y AB745488.1). Sin embargo, las de los clones obtenidos a partir de la cepa de referencia de *C. mellificae* ATCC30254 diferían de las anteriores en una posición nucleotídica.

Esta única diferencia se consideró relevante, ya que cualquier variación en un marcador tan conservado como el *18S rDNA*, que presenta hasta un 99% de homología entre diferentes géneros de Tripanosomátidos (*Leptomonas*, *Crithidia*, *Leishmania*,

Wallaceina, *Blastocrithidia* y *Endotrypanum*) (Cepero y col., 2015b), sugiere que la cepa *C. mellificae* ATCC30254 y las secuencias obtenidas (Tabla 30) podrían representar diferentes organismos.

Tabla 30.- Estima de la divergencia evolutiva entre pares de secuencias del gen 18S rDNA (expresado en porcentaje)

Muestra (Clon/es)	Muz	Yang I	ATCC (1-10)	324 (1-9)	324 (10)	325 (1-4 y 8)	325 (5)	325 (6,7,9,10)	1980 (4 y 7-10)	1980 (6)
Muz										
Yang I	0.00									
ATCC (1-10)	0.26	0.26								
324 (1-9)	0.00	0.00	0.26							
324 (10)	0.26	0.26	0.52	0.26						
325 (1-4 y 8)	0.00	0.00	0.26	0.00	0.26					
325 (5)	0.52	0.52	0.78	0.52	0.78	0.52				
325 (6,7,9,10)	0.26	0.26	0.52	0.26	0.52	0.26	0.78			
1980 (4 y 7-10)	0.00	0.00	0.26	0.00	0.26	0.00	0.52	0.26		
1980 (6)	0.26	0.26	0.52	0.26	0.52	0.26	0.78	0.52	0.26	

El color amarillo señala las secuencias procedentes de *GenBank* mientras que el color verde representa las secuencias obtenidas en este estudio, apareciendo los clones en paréntesis junto a la muestra de la que proceden. Las comparaciones entre la cepa de referencia ATCC30254 y las presuntas secuencias de *C. mellificae* están destacadas en color gris.

El análisis de las distancias genéticas entre las secuencias del gen *GAPDH* mostraron que *C. mellificae* ATCC30254 (KJ704273 - KJ704282) presentaba una divergencia de $6,89 \pm 1,32\%$ con respecto al resto de las secuencias, lo que incluye tanto a las depositadas en *GenBank* (AB716357.1, AB745489.1 y JF423199.1) como a las obtenidas en este estudio (KJ704252 - KJ704272) (las cuales, por cierto, eran muy similares a AB716357.1 y AB745489.1; Tabla 31).

Tabla 31.- Estimación de la divergencia total entre pares de secuencias de GAPDH (expresada en porcentaje)

Muestra (Clon/es)	Yang II	Morimoto	Runckel	324 (1 y 6)	324 (9)	325 (1)	325 (2,3,6-8,10)	325 (5 y 9)	1980 (2 y 8)	1980 (3-7, 9, 10)	ATCC (1 y 3)	ATCC (2, 9, 10)	ATCC (4,5,7)	ATCC (6 y 8)
Yang II														
Morimoto	0													
Runckel	0.27	0.27												
324 (1 y 6)	1.07	1.07	1.34											
324 (9)	0.27	0.27	0.53	1.34										
325 (1)	1.07	1.07	1.34	0.53	1.34									
325 (2,3,6-8,10)	0	0	0.27	1.07	0.27	1.07								
325 (5 y 9)	0.27	0.27	0.53	1.34	0.53	1.34	0.27							
1980 (2 y 8)	1.07	1.07	1.34	0.53	1.34	0.53	1.07	1.34						
1980 (3-7, 9, 10)	0	0	0.27	1.07	0.27	1.07	0	0.27	1.07					
ATCC (1 y 3)	6.94	6.94	6.65	8.12	7.23	8.12	6.94	7.23	8.12	6.94				
ATCC (2, 9, 10)	6.36	6.36	6.08	7.53	6.65	7.53	6.36	6.65	7.53	6.36	0.80			
ATCC (4,5,7)	6.65	6.65	6.36	7.82	6.94	7.82	6.65	6.94	7.82	6.65	1.07	0.27		
ATCC (6 y 8)	6.65	6.65	6.36	7.82	6.94	7.82	6.65	6.94	7.82	6.65	0.27	0.53	0.80	

El color amarillo señala las secuencias procedentes de *GenBank* mientras que el color verde representa las secuencias obtenidas en este estudio, apareciendo los clones en paréntesis junto a la muestra de la que proceden. Las comparaciones entre la cepa de referencia ATCC30254 y las supuestas secuencias de *C. mellificae* se destacan en gris.

Los valores anteriormente mencionados corresponden a datos de divergencia total, es decir, aquella que se calcula utilizando todos los cambios nucleotídicos (sinónimos y no sinónimos) que existen entre las secuencias. Sin embargo, es importante señalar que este modo de evaluar la distancia genética subestima los niveles de divergencia puesto que da el mismo peso a todas las posiciones, cuando los lugares de sustitución representan casi el 75% de la secuencia codificante y acumulan muchas menos mutaciones que los sinónimos por la acción que ejerce la selección para evitar sus efectos deletéreos. Por lo tanto, para obtener estimas más fiables sólo se tuvieron en cuenta los sitios sinónimos (Tabla 32), los cuales se consideran prácticamente neutros. Este análisis demostró que *C. mellificae* ATCC30254 y el resto de las secuencias de tripanosomátidos (incluidas las consideradas como *C. mellificae* en *GenBank*) representaban organismos distintos con una alto nivel de divergencia sinónima ($23,47 \pm 5,48\%$, Tabla 32).

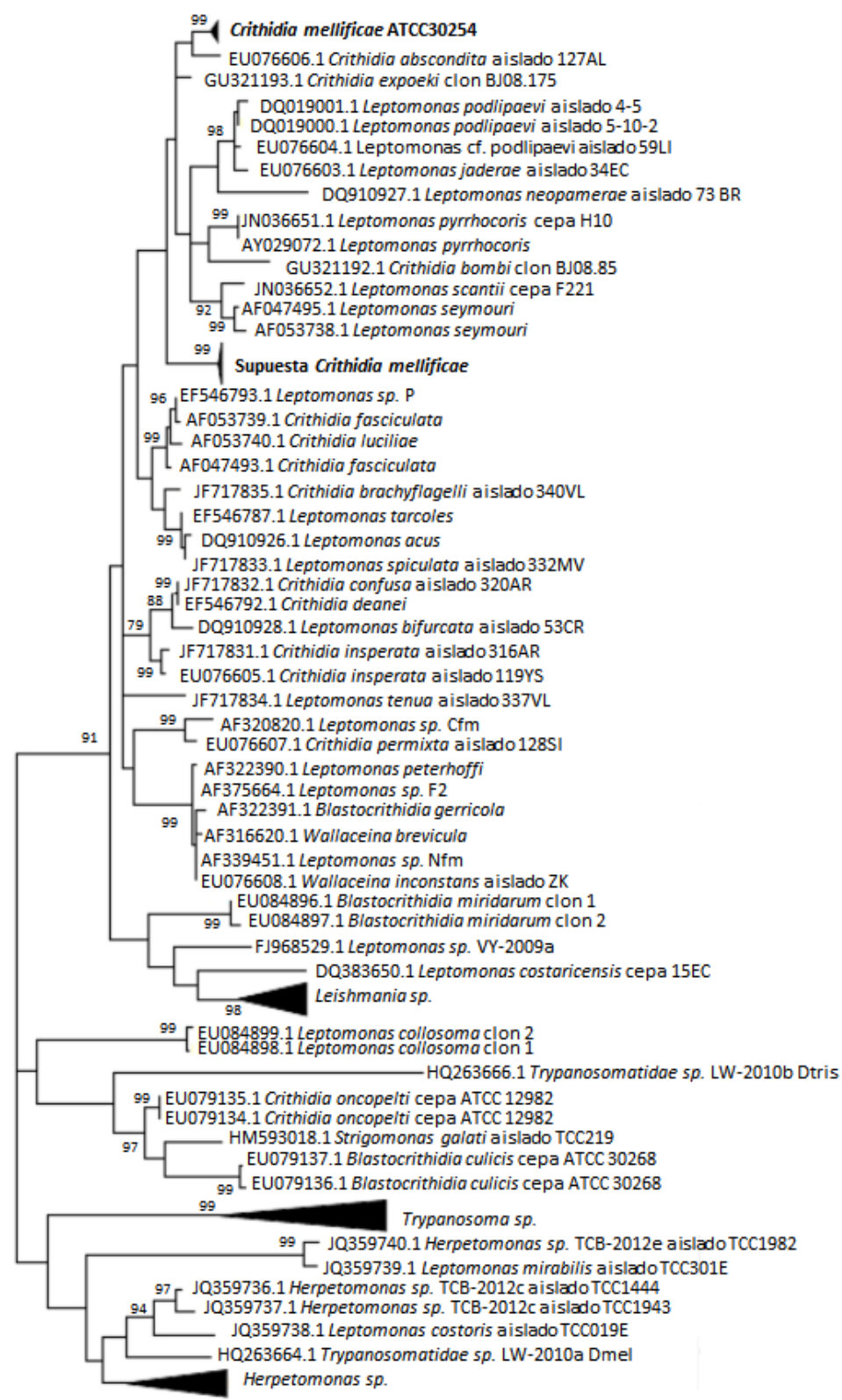
Table 32.- Estimación de la divergencia sinónima entre pares de secuencias del gen *GAPDH* (expresada en porcentaje)

Muestra (Clon/es)	Yang II	Morimoto	Runckel	324 (1 y 6)	324 (9)	325 (1)	325 (2-10)	1980 (2)	1980 (3-7,9,10)	1980 (8)	ATCC (1 y 3)	ATCC (2,9,10)	ATCC (4,5,7)	ATCC (6 y 8)
Yang II														
Morimoto	0													
Runckel	0	0												
324 (1 y 6)	1.58	1.58	1.58											
324 (9)	0	0	0	1.58										
325 (1)	1.60	1.60	1.60	0	1.60									
325 (2-10)	0	0	0	1.58	0	1.60								
1980 (2)	1.58	1.58	1.58	0	1.58	0	1.58							
1980 (3-7,9,10)	0	0	0	1.58	0	1.60	0	1.58						
1980 (8)	1.60	1.60	1.60	0	1.60	0	1.60	0	1.60					
ATCC (1 y 3)	24.66	24.66	24.66	26.77	24.66	26.30	24.66	26.77	24.66	26.30				
ATCC (2,9,10)	21.80	21.80	21.80	23.83	21.80	23.36	21.80	23.83	21.80	23.36	3.23			
ATCC (4,5,7)	23.21	23.21	23.21	25.29	23.21	24.81	23.21	25.29	23.21	24.81	4.34	1.06		
ATCC (6 y 8)	23.21	23.21	23.21	25.29	23.21	24.81	23.21	25.29	23.21	24.81	1.06	2.14	3.23	

El color amarillo señala las secuencias procedentes de *GenBank* mientras que el color verde representa las secuencias obtenidas en este estudio, apareciendo los clones en paréntesis junto a la muestra de la que proceden. Las comparaciones entre la cepa de referencia ATCC30254 y las supuestas secuencias de *C. mellificae* aparecen destacadas en gris.

Para ilustrar estas diferencias se realizó un análisis filogenético de las secuencias del gen *GAPDH* y se construyó un árbol que se muestra en la figura 22. La dispersión de las secuencias de *Crithidia* sp. (Figura 22), cuestiona la clasificación taxonómica de muchas especies de este género. Por esta razón, las secuencias generadas en este estudio, excepto las obtenidas de la cepa de referencia ATCC30254 de *C. mellificae*, se depositaron en *GenBank* bajo la denominación genérica de *Trypanosomatidae* sp.

Figura 22.- Análisis filogenético de las secuencias del gen GAPDH de tripanosomátidos.



Se realizó un análisis filogenético de las secuencias del gen GAPDH utilizando el método de máxima verosimilitud (basado en el modelo de tiempo general reversible, asumiendo una distribución Gamma y permitiendo que algunos sitios fueran evolutivamente invariables). En este árbol filogenético se incluyeron todos los lugares (sinónimos, no sinónimos y no codificantes) y no sólo los sinónimos, como en la tabla anterior.

Dada la variabilidad genética encontrada y la alta probabilidad de que se trate de más de una especie, de aquí en adelante se mantuvo el término Tripanosomátidos en lugar de utilizar *Crithidia mellificae*, ya que este estudio demuestra que no todos los organismos detectados corresponden a *C. mellificae* pero si hay otros tripanosomátidos como la especie *Lotmaria passim*.

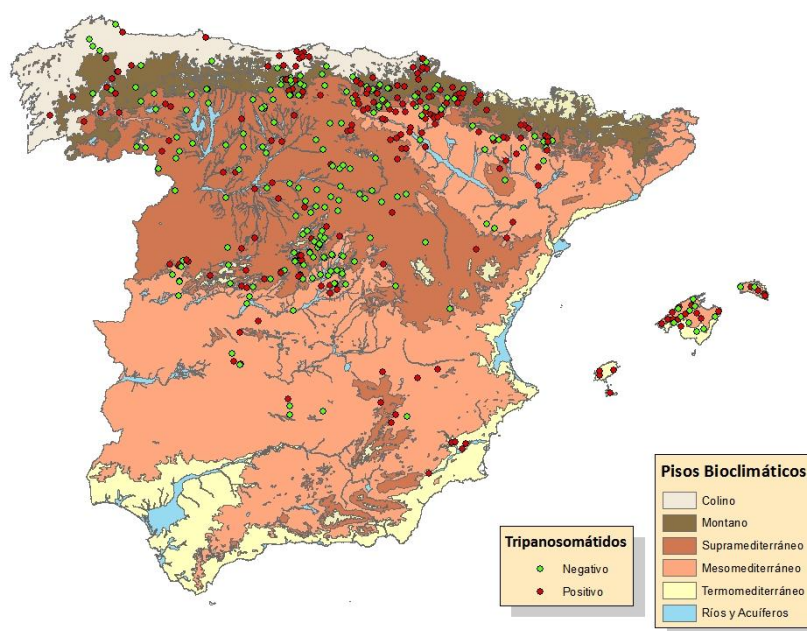
7.3.1.2.4.2. Prevalencia de los tripanosomátidos

La prevalencia media en el año 2010 fue 68,9 % (Tabla 33), mientras que en el año 2011 ésta fue significativamente inferior (38,2%) ($\chi^2=58,3$; $p<0,05$).

Tabla 33.- Prevalencias anuales de los tripanosomátidos

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	68,9	64	73,8
2011	38,2	32,3	44,1

Figura 23.- Distribución espacial del número de muestras de tripanosomátidos según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Tras agrupar los dos años de estudio, la presencia de los tripanosomátidos no parece estar influenciada por las condiciones climáticas (Fig 23), ya que los valores de prevalencia resultaron ser bastante elevados en todos los pisos (Tabla 34), con un valor mayor en el piso termomediterráneo y menor en el piso supramediterráneo. En primer

lugar, se realizó una comparación de las prevalencias encontradas en todos los pisos frente al piso supramediterráneo, dando lugar a diferencias significativas entre todos ellos. Por ello, a continuación se agruparon los pisos por parejas (Tabla 34) entre los pisos mesomediterráneo y montano, colino y mesomediterráneo y, por último, termomediterráneo y colino para comprobar alguna posible relación pero no hubo resultados significativos en ninguno de los casos.

Tabla 34.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de los tripanosomátidos a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos Tripanosomátidos	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Supramediterráneo (G)	181	39,2	-	-						
Montano (C)	96	55,2	5,85	0,0156*						
Mesomediterráneo (H)	197	60,9	16,89	0,0000*	0,6489	0,4205 ^a				
Colino (D)	34	70,6	10,18	0,0014*			0,8456	0,3578 ^b		
Termomediterráneo (I)	26	84,6	10,18	0,0014*					0,9313	0,3345 ^c

*Comparación frente a piso G

^aComparación frente a C

^bComparación frente a H

^cComparación frente a D

7.3.1.2.5. *Ascosphaera apis*

La prevalencia media anual de *A. apis* fue similar en ambos periodos de muestreo ($\chi^2 = 0,31$; $p > 0,05$) (Tabla 35).

Tabla 35.- Prevalencias anuales de *A. apis*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	5,3	2,8	7,7
2011	4	1,5	6,5

Al unificar ambos años de estudio (Tabla 36) *A. apis* apareció distribuido en todos los pisos mostrando valores de prevalencia más reducidos en los pisos montano y termomediterráneo, concentrándose principalmente en el ambiente de tipo colino (Fig 24) de forma significativa con respecto a los demás pisos.

Figura 24.- Distribución espacial del número de muestras de *A. apis* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)

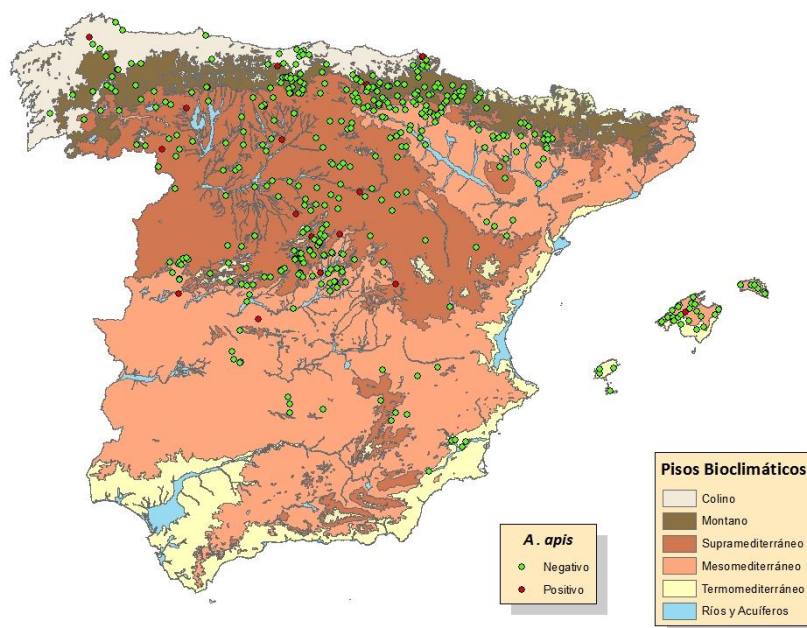


Tabla 36.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *A. apis* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>A. apis</i>	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2
Montano (C)	96	1	-	-	
Termomediterráneo (I)	26	3,8	0	0,8978	
Mesomediterráneo (H)	197	4,1	1	0,296	-
Supramediterráneo (G)	181	6,1	3	0,0991	-
Colino (D)	34	11,8	5	0,0229	5,5294

* Comparación con el piso C

7.3.1.2.6. *Paenibacillus larvae*

La prevalencia media anual de *P. larvae* fue inferior al 2% (Tabla 37), tanto en 2010 (1,4%) como en 2011 (1,1%), y no presentaron diferencias significativas a nivel nacional ($\chi^2=0,00$, $p>0,05$).

Tabla 37.- Prevalencias anuales de *P. larvae*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	1,4	0,5	3,2
2011	1,1	0,2	3,2

El análisis conjunto de los dos años de estudio reveló que la prevalencia para esta bacteria fue mayor en el piso colino y menor en el piso supramediterráneo (Fig 25), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los pisos analizados (Tabla 38). *Melissococcus plutonius* no fue detectado en los pisos montano y termomediterráneo

Figura 25.- Distribución espacial del número de muestras de *P. larvae* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)

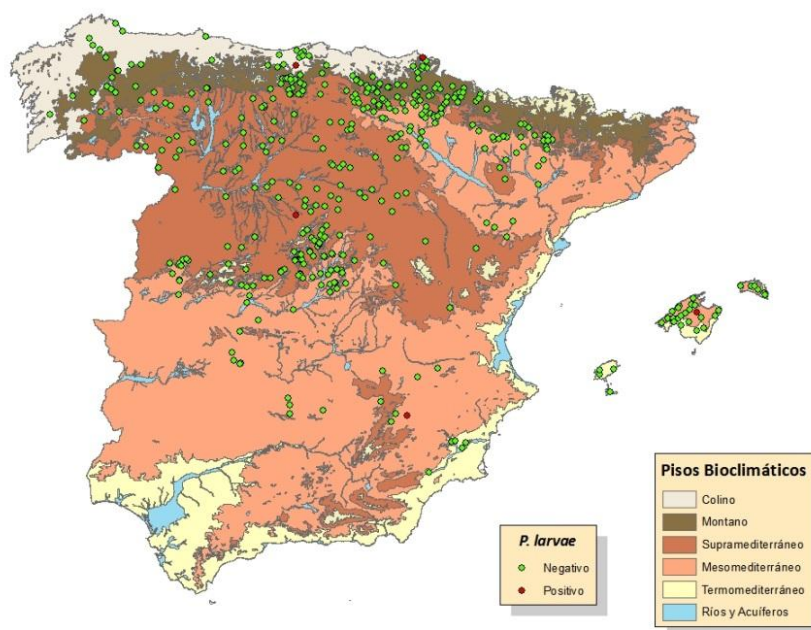


Tabla 38.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *P. larvae* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>P. larvae</i>	N	%	χ^2	p
Montano (C)	96	0	-	-
Termomediterráneo (I)	26	0	0,01*	0,9241
Supramediterráneo (G)	181	1,1	0,01*	0,9117
Mesomediterráneo (H)	197	2	0,18*	0,6739
Colino (D)	34	5,9	2,66*	0,1026

* Comparación con el piso C

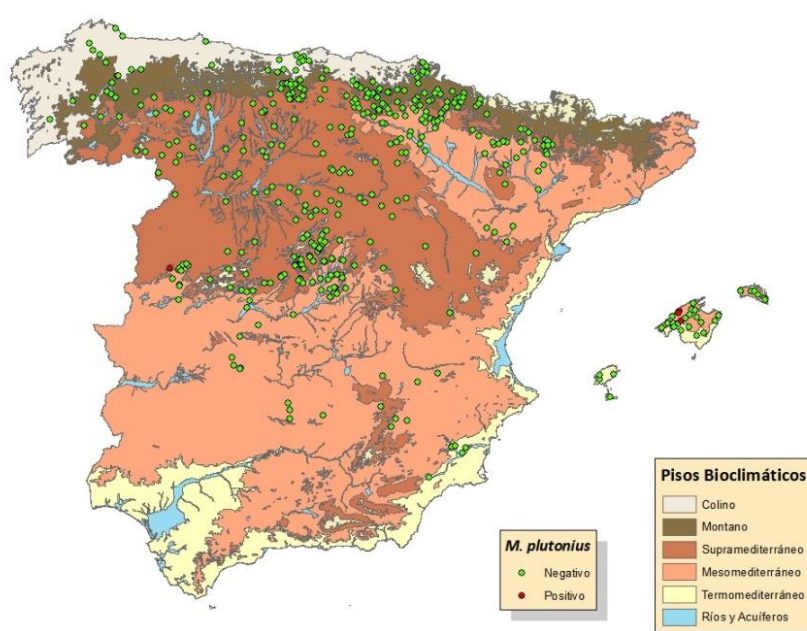
7.3.1.2.7. *Melissococcus plutonius*

La prevalencia media anual de las muestras positivas a *M. plutonius* se vio incrementada de manera significativa ($\chi^2=3,78$; $p= 0,05$) en 2011 (3,3%) con respecto al año 2010 (0,8 %) (Tabla 39).

Tabla 39.- Prevalencias anuales de *M. plutonius*

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	0,8	0,2	2,4
2011	3,3	1	5,6

Figura 26.- Distribución espacial del número de muestras de *M. plutonius* según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Estudiando ambos años en conjunto, la presencia de *M. plutonius* no fue detectada en los pisos de climas más fríos (montano, colino y supramediterráneo; Fig 26). La prevalencia en el piso termomediterráneo fue ligeramente superior al piso mesomediterráneo (Tabla 40) y alcanzó significación estadística.

Tabla 40.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de *M. plutonius* a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos <i>M. plutonius</i>	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2
Montano (C)	96	0	-	-	
Colino (D)	34	0	0	0,9522*	
Supramediterráneo (G)	181	0	0	0,7687*	
Mesomediterráneo (H)	197	1,5	0	0,7687*	-
Termomediterráneo (I)	26	7,7	4	0,0489*	3,9885

* Comparación con el piso C

7.3.1.2.8. Virus en las abejas adultas

A continuación se presentan los valores de las prevalencias obtenidos para seis de los virus que infectan a las abejas, analizados dentro de este estudio.

7.3.1.2.8.1. Control interno: β – actina

La medida de la expresión del gen de la β – actina de la abeja es un método que se utiliza habitualmente como control interno tras la realización de la retrotranscripción y PCR (RT-PCR) para confirmar el buen estado del ARN de las muestras así como para asegurarnos del correcto funcionamiento de la RT-PCR, indicando que si la reacción de PCR es negativa en un pocillo no se trata de un falso negativo por fallo de la técnica. Por norma general, para el estudio de los diferentes virus se seleccionarían solo aquellas muestras que resultasen positivas. Sin embargo, en este caso la detección de los virus por técnicas moleculares se realizó en todas las muestras independientemente de si fueron positivas o negativas para β – actina.

Al analizar los resultados se pudo observar que una gran parte de los resultados negativos a β – actina fueron positivos por lo menos a uno de los virus estudiados (Tabla 41). Los resultados positivos a la β – actina presentaron la misma proporción de porcentajes positivos que para los negativos, lo cual indica que en nuestro estudio la expresión de β – actina no es un buen control interno puesto que el ARNm para el que codifica se degrada antes que el ARN viral.

Tabla 41.- Porcentaje de la cantidad de virus detectados respecto a las muestras negativas y positivas a la β – actina.

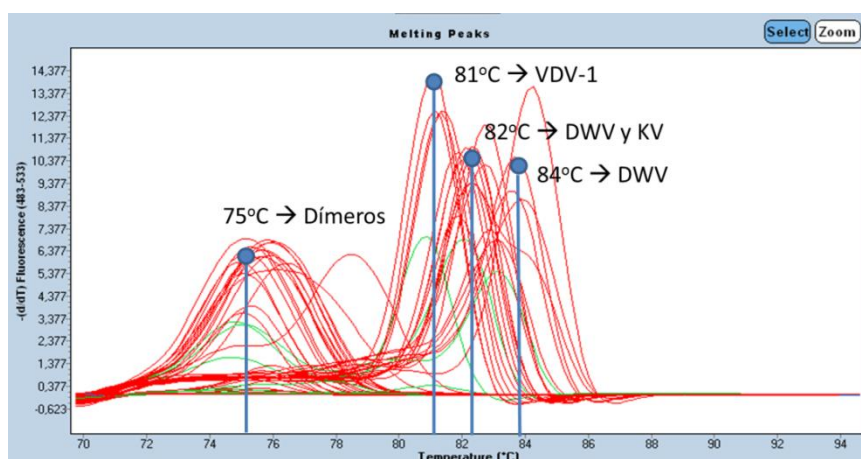
β -actina	2010		2011	
	Negativo a todos los virus	1 ó más virus detectados	Negativo a todos los virus	1 ó más virus detectados
Negativo (%)	23,63	76,36	20,45	79,54
Positivo (%)	15,54	84,45	17,32	82,67

7.3.1.2.8.2. Virus de las alas deformadas (DWV)

7.3.1.2.8.2.1.a. Especificidad del método de qRT-PCR utilizando SYBRGreen

Al observar las curvas de fusión de las muestras de abejas adultas se detectaron cuatro grupos de temperaturas de fusión (Fig 27). Las curvas obtenidas a diferentes temperaturas de fusión indican que se están amplificando cosas distintas. A esto hubo que sumarle que la temperatura de la publicación de referencia (Kukielka y col., 2008a) a la que teóricamente se obtienen las curvas de fusión para este virus (84,5°C) no coincidía con los resultados obtenidos. Por ello, se seleccionaron productos de qRT-PCR de cada grupo de temperaturas y se secuenciaron. Al comparar los resultados de la secuenciación con las secuencias depositadas en *GenBank* se comprobó que la temperatura de fusión de 75°C correspondía a dímeros de cebadores, los positivos con temperatura de fusión de 81°C se correspondían con positivos del virus *V. destructor* tipo 1 (Fig 27), y que los otros dos grupos de temperaturas de fusión se unificaron formando un rango comprendido entre 82-84°C que correspondía a positivos de DWV y KV. Finalmente esto demostró que la pareja de cebadores DWV 1 y 2 (Kukielka y col., 2008a) son inespecíficos ya que amplifican tanto al virus *V. destructor* tipo 1 (VDV-1), como al virus Kakugo (KV) que están muy relacionados con el virus de las alas deformadas, al que también amplifican.

Figura 27.- Resultado del análisis de varias muestras para la detección de DWV utilizando Q-PCR con SYBR Green



Por lo tanto, las muestras que presentaron temperaturas de fusión comprendidas entre 80,5 – 84°C se consideraron positivas para el complejo de virus DWV - VDV1 - KV.

7.3.1.2.8.2.1.b. Comparación de sensibilidad por ambos métodos

A la hora de detectar DWV en un total de 100 muestras escogidas al azar la técnica de PCR cuantitativa con SYBR Green (19% de resultados positivos) mostró una sensibilidad muy similar a la técnica que emplea sondas TaqMan (18% positivos). En igualdad de condiciones, se eligió el empleo de sondas para el estudio de prevalencias de este virus porque los cebadores son más específicos que los utilizados para la técnica con SYBR Green.

7.3.1.2.8.2.2. Prevalencia de DWV

La prevalencia media anual de DWV (Tabla 42) fue estadísticamente superior ($\chi^2 = 8,01$; $p < 0,05$) en el año 2011 (52,7%) en comparación con el 2010 (41,1%).

Tabla 42.- Prevalencias anuales de DWV

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	41,1	35,9	46,3
2011	52,7	46,6	58,8

Figura 28.- Distribución espacial del número de muestras de DWV según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)

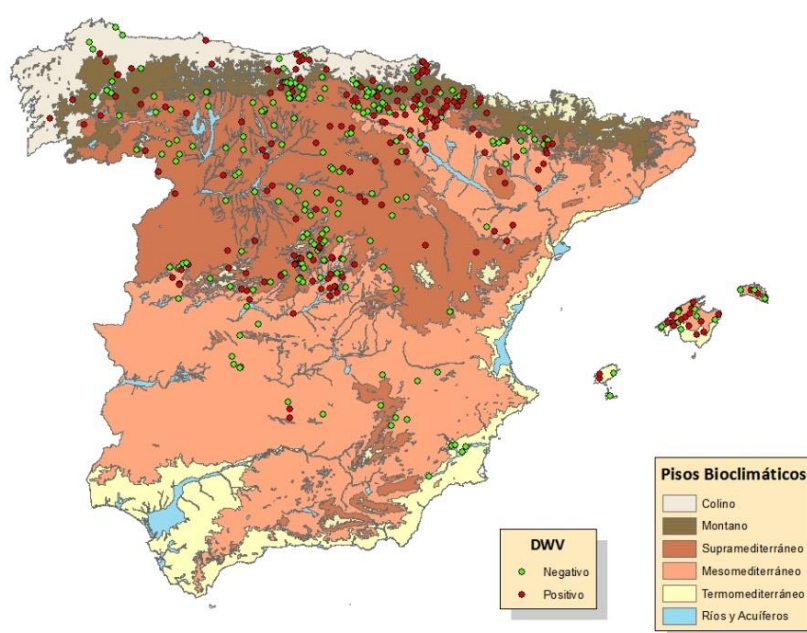


Tabla 43.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de DWV a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos DWV	N	%	χ^2	<i>p</i>	χ^2	g.l	<i>p</i>
Supramediterráneo (G)	181	38,1	-	-			
Montano (C)	96	42,7	0,4	0,5396*			
Mesomediterráneo (H)	197	49,2	0,4	0,5396*	-	-	-
Termomediterráneo (I)	26	57,7	2,9	0,0916*	-	-	-
Colino (D)	34	67,6	9	0,0027*	4,2331**	2	0,1204

* Comparación con el piso G

** Comparación entre niveles H, I, D.

7.3.1.2.8.3. Virus de las realeras negras (BQCV)

7.3.1.2.8.3.1.a. Especificidad del método de qRT-PCR utilizando SYBRGreen

Como en el caso anterior, al analizar las curvas de fusión para este virus se observaron distintos grupos de temperaturas que diferían de la temperatura teórica de las curvas de fusión (84°C) establecida para considerar una muestra positiva a BQCV (Kukielka y col., 2008a). Por lo tanto, se seleccionaron varias muestras de cada uno de los cinco grupos de temperaturas de fusión observados en las curvas. Dichas muestras fueron secuenciadas y, por medio del programa BLAST, se compararon con las secuencias de BQCV depositadas en *GenBank*. Gracias a estos análisis se pudo comprobar que todas las muestras procedentes de los cinco grupos de temperaturas de fusión pertenecían a BQCV y, por ello, entre 81,5- 83°C es la temperatura de fusión en la que se obtienen las curvas de fusión correspondientes a los positivos a este virus.

7.3.1.2.8.3.1.b. Comparación de sensibilidad por ambos métodos

Tras el análisis de 100 muestras elegidas al azar, la técnica de PCR cuantitativa con sonda TaqMan presentó 16 veces más sensibilidad (detectó un 24% de positivos) que el empleo de SYBR Green (8% de positivos) para la detección de BQCV. Por eso se escogió la técnica molecular que emplea sondas para realizar el estudio de la prevalencia de este virus.

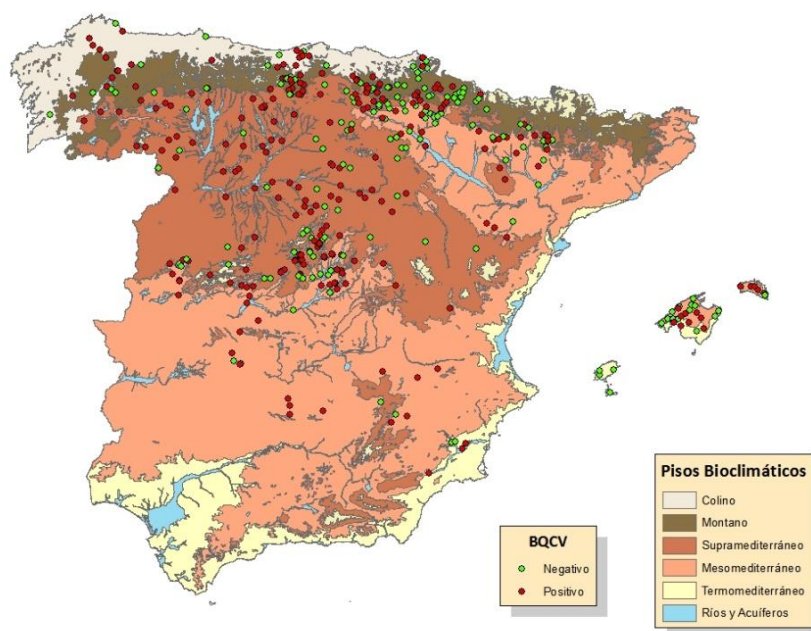
7.3.1.2.8.3.2. Prevalencia de BQCV

La prevalencia media anual de BQCV (Tabla 44) fue ligeramente inferior en el año 2011 (54,9%) con respecto al 2010 (68,3%) sin diferencias estadísticamente relevantes ($\chi^2=11,4$; $p<0,05$).

Tabla 44.- Prevalencias anuales de BQCV

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	68,3	63,4	73,3
2011	54,9	48,8	61

Figura 29.- Distribución espacial del número de muestras de BQCV según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al estudiar ambos años de forma conjunta, la presencia de BQCV alcanzó su valor máximo de prevalencia en el piso supramediterráneo (Fig 29) y el menor para el piso termomediterráneo. Aunque en el resto de pisos se detectó con valores de prevalencia bastante elevados (Tabla 45) en ningún caso hubo diferencias significativas.

Tabla 45.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de BQCV a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos BQCV	N	%	χ^2	p
Termomediterráneo (I)	26	53,8	-	-
Montano (C)	96	56,3	0,00*	0,9971
Colino (D)	34	58,8	0,02*	0,9024
Mesomediterráneo (H)	197	62,4	0,40*	0,5277
Supramediterráneo (G)	181	73,5	3,36*	0,0669

* Comparación con el piso I

7.3.1.2.8.4. Complejo ABPV-KBV-IAPV

7.3.1.2.8.4.1. Especificidad

No se pudo realizar el análisis de los tres virus de forma independiente debido a la escasa cantidad de muestra de partida.

7.3.1.2.8.4.2. Prevalencia del complejo ABPV-KBV-IAPV

La prevalencia media anual de los virus incluidos dentro de este complejo (Tabla 46) no fue significativamente diferente en 2010 (5,8%) respecto a 2011 (7,3%) ($\chi^2=0,27$; $p>0,05$).

Tabla 46.- Prevalencias anuales del complejo ABPV-KBV-IAPV

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	5,8	3,3	8,4
2011	7,3	4	10,5

La prevalencia del complejo ABPV-KBV-IAPV fue menor, en todos los pisos bioclimáticos estudiados, a la de de otros agentes nosógenos incluidos en el presente estudio (Tabla 47). El mayor número de muestras positivas se localizaron en el piso montano (Fig 30).

Figura 30.- Distribución espacial del número de muestras del complejo ABPV-KBV-IAPV según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)

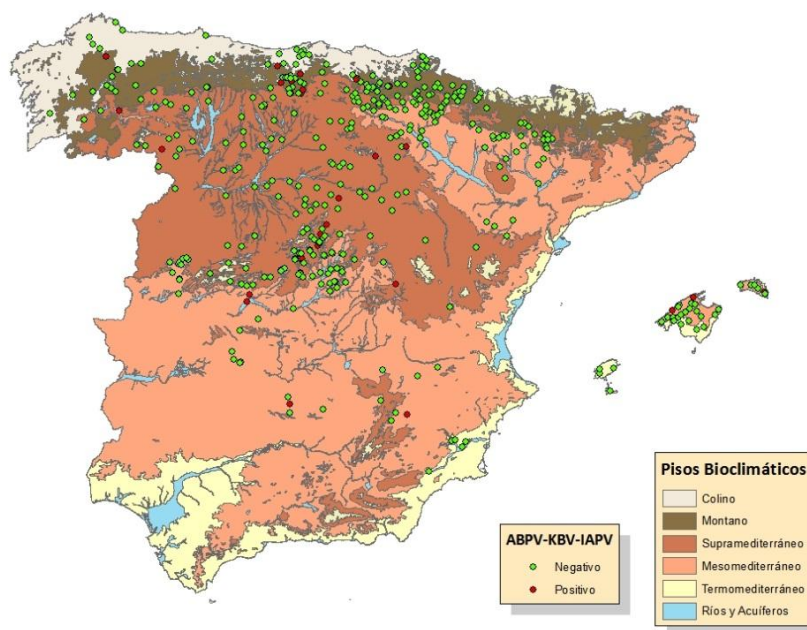


Tabla 47.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos del complejo ABPV-KBV-IAPV a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos ABPV-KBV-IAPV	N	%	χ^2	p
Termomediterráneo (I)	26	0	-	-
Colino (D)	34	5,9	0,07*	0,7947
Mesomediterráneo (H)	197	6,6	0,08*	0,776
Supramediterráneo (G)	181	6,6	0,09*	0,7705
Montano (C)	96	9,4	0,51*	0,4734

* Comparación con el piso I

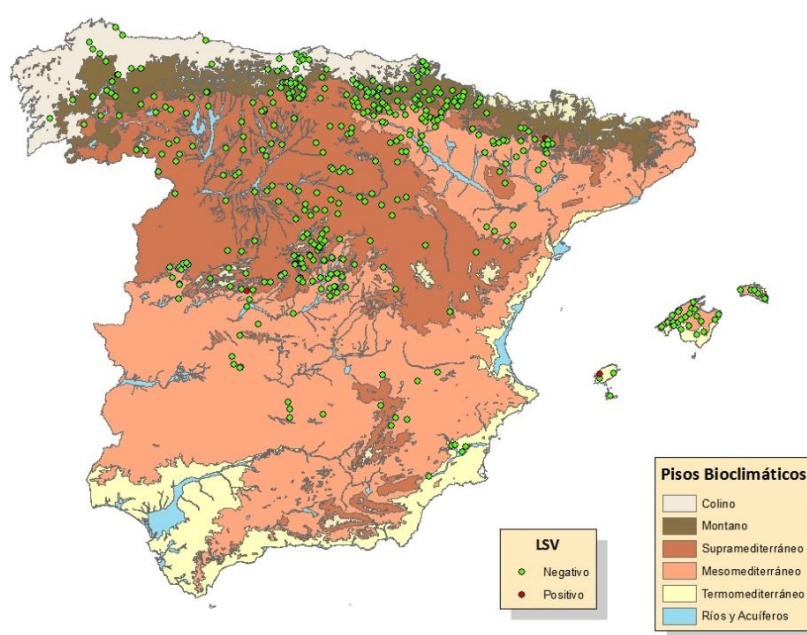
7.3.1.2.8.5. Lake Sinai Virus (LSV)

La prevalencia media anual del virus LSV fue del 2,2% en 2010 y del 0,4% en 2011 (Tabla 48), no siendo significativamente diferentes estos valores ($\chi^2=2,56$; $p>0,05$).

Tabla 48.- Prevalencias anuales de LSV

Año	Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Inf	Sup
2010	2,2	0,6	3,9
2011	0,4	0	2

Figura 31.- Distribución espacial del número de muestras de LSV según los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al agrupar ambos años de estudio, las muestras positivas a este virus se concentraron principalmente en el piso termomediterráneo y de forma minoritaria en el piso mesomediterráneo (Tabla 49; Fig 31). Mientras que no fue detectado en los pisos montano y colino, sin diferencias significativas entre los pisos analizados.

Tabla 49.- Número de positivos, prevalencia y pruebas estadísticas de comparación entre la distribución en pisos climáticos de LSV a lo largo de los dos años de estudio

Pisos climáticos LSV	N	%	χ^2	p
Montano (C)	96	0	-	-
Colino (D)	34	0	0,00*	0,9522
Mesomediterráneo (H)	197	1	0,04*	0,8471
Supramediterráneo (G)	181	1,7	0,05*	0,8175
Termomediterráneo (I)	26	3,8	1,37*	0,2415

* Comparación con el piso C

7.3.1.2.9. *Aethina tumida*

7.3.1.2.9.1. Sensibilidad de la técnica

El método utilizado fue capaz de detectar el ADN de una sola larva en una mezcla de 34 muestras procedentes de la comunidad de Madrid. La eficiencia obtenida en la técnica de PCR fue del 93,35% para las larvas del pequeño escarabajo de las colmenas y 95,5% para los adultos. Por lo tanto, el método descrito demostró ser una herramienta muy valiosa en los programas de vigilancia para identificar la aparición de esta especie, ya que permite detectar rápidamente el ADN de los huevos, larvas y ejemplares adultos de *A. tumida* entre los restos del fondo de las colmenas.

7.3.1.2.9.2. Prevalencia de *A. tumida*

Se analizaron muestras de restos del fondo de colmenas procedentes de 10 comunidades autónomas y, como era de esperar, no se detectó ADN de *A. tumida* en ninguna de las muestras analizadas. Confirmando por tanto la ausencia de este insecto en las colonias de abejas españolas.

7.3.1.3. Asociación de patógenos

Se realizó un estudio para comparar si un determinado positivo a un patógeno se relaciona epidemiológicamente con los positivos a *V. destructor*, *N. apis* y *N. ceranae* durante los dos años de estudio.

Varroa destructor presentó una asociación significativa con los virus DWV y BQCV. La asociación entre varroa y DWV demostró una correlación positiva entre ambos con significación estadística (Tabla 50), de manera que en los colmenares en los que se detectó la presencia de varroa, se detectó con mayor frecuencia DWV (66,5%). Por el contrario, en aquellos colmenares en los que se detectó varroa, la presencia de BQCV fue menor (56,5%), mostrando así la existencia de una correlación negativa entre varroa y BQCV (Tabla 50). Los tripanosomátidos también presentaron una correlación positiva con varroa, siendo más frecuentes en las colmenas donde apareció varroa (59,1%) que donde no (51,2%), aunque esta asociación no alcanzó la significación estadística (Tabla 50). El resto de patógenos se repartió de forma similar independientemente de la presencia de *V. destructor*.

Nosema apis solo se asoció con la ausencia del complejo ABPV-KBV-IAPV, de forma que este complejo de virus fue más prevalente en los colmenares donde no estaba presente dicho microsporidio (7,4%), dando lugar a una correlación negativa entre ellos que resultó ser estadísticamente significativa (Tabla 50).

La presencia de *Nosema ceranae* únicamente se asoció negativamente con *M. plutonius* (Tabla 50), donde se observó una mayor prevalencia de la bacteria con diferencias significativas en los colmenares en los que no se obtuvieron registros de *N. ceranae* (4%).

Tabla 50.- Análisis univariante de la distribución de los distintos patógenos analizados en función de la presencia de *N.ceranae*, *N. apis* y *V. destructo* a lo largo de los dos años de muestreo

Presencia	Prueba estadística	<i>A. woodi</i>	Neogreg	Tripanos	<i>A. apis</i>	<i>M. plutonius</i>	<i>P. larvae</i>	DWV	BQCV	AKI	LSV
<i>V. destructor</i>	χ^2	0,063	0,182	3,608	1,387	1,174	0,002	129,6	11,509	1,52	0,109
	<i>p</i>	0,802	0,669	0,057	0,238	0,278	0,962	0,000*	0,000*	0,22	0,741
<i>N. apis</i>	χ^2	3,616	2,593	0,1	0,317	0,25	0,002	3,33	1,78	4,54	0,013
	<i>p</i>	0,057	0,107	0,752	0,574	0,617	0,965	0,068	0,182	0,033*	0,907
<i>N. ceranae</i>	χ^2	0,002	0,004	0,004	0,752	4,271	0,051	0,582	1,028	1,943	0,568
	<i>p</i>	0,961	0,951	0,951	0,448	0,039*	0,822	0,445	0,311	0,163	0,45

*valores significativos

7.3.1.4. Análisis patógenos/mortalidad de colonias

Se aplicó el test Chi-cuadrado para comprobar si existía alguna relación entre la presencia de cada patógeno analizado de forma independiente, en primer lugar, con respecto a la pérdida de colonias y, en segundo lugar, con la presencia de despoblamiento en los colmenares pertenecientes a los apicultores encuestados (Tabla 51).

En el primer caso, se observó una relación significativa entre la presencia de tripanosomátidos y la pérdida de colonias. De otra parte se obtuvo una relación significativa entre la presencia de las dos especies del género *Nosema* y la pérdida de colonias de abejas (Tabla 51).

Respecto al despoblamiento, según la Tabla 51, únicamente mostró relación con la ausencia de tripanosomátidos y la presencia de BQCV, ya que fueron los únicos patógenos que presentaron datos con significación estadística.

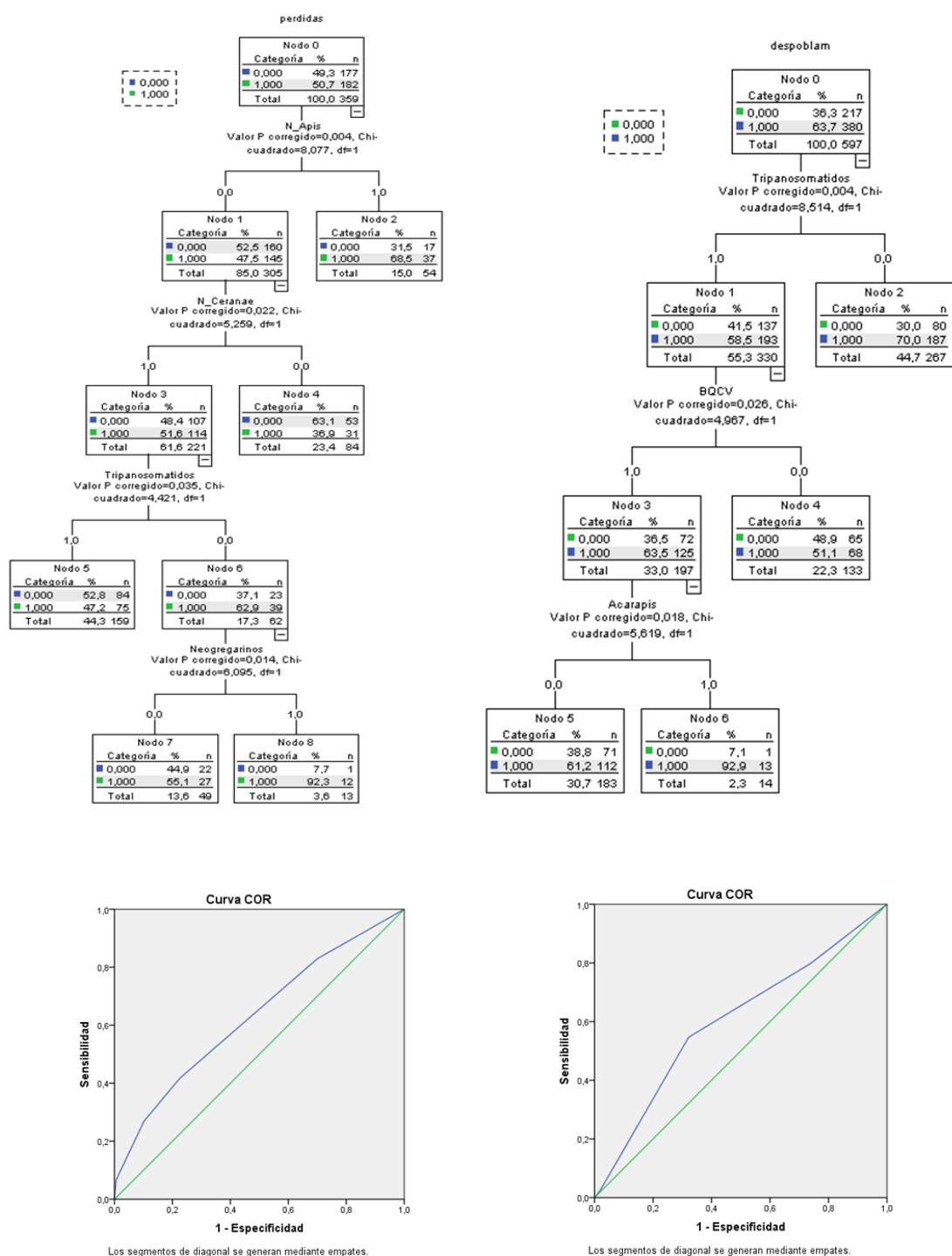
Tabla 51.- Resultado de aplicar el test Chi-cuadrado a los distintos patógenos en relación con la pérdida de colonias y la presencia de despoblamiento.

Patógeno	Pérdida de colonias		Despoblamiento	
	χ^2	p	χ^2	p
<i>Varroa destructor</i>	1,1097	0,2926	1,925	0,1653
<i>Acarapis woodi</i>	0,4332	0,5104	0,9608	0,327
<i>Nosema apis</i>	6,0333	0,014*	2,3014	0,1293
<i>Nosema ceranae</i>	4,3737	0,0365*	2,7058	0,1
Neogregarinos	3,8273	0,0504	0,0591	0,8079
Tripanosomátidos	26,0567	<.0001*	8,5137	0,0035*
<i>Ascosphaera apis</i>	1,0245	0,3115	0,1096	0,7407
<i>Melissococcus plutonius</i>	0,0014	0,9704	2,0504	0,1522
<i>Paenibacillus larvae</i>	1,7187	0,1899	0,1297	0,7187
DWV	1,1055	0,2931	0,362	0,5474
BQCV	0,4579	0,4986	7,625	0,0058*
AKI	0,7277	0,3936	0,0337	0,8544
LSV	1,9255	0,1652	0,7881	0,3747

* valores significativos

A continuación se construyó un árbol de decisión para conocer si existía alguna relación entre la pérdida de colonias de abejas o el despoblamiento con respecto a los patógenos analizados. Dichos árboles (Fig 32) reflejaron la misma situación que aparece en la Tabla 51. Sin embargo, al realizar la curva ROC de cada árbol, se obtuvieron valores muy pequeños del área bajo la curva (0,62 para pérdidas y 0,60 para despoblamiento), lo que indica que las variables elegidas (patógenos) no presentan la robustez suficiente para explicar por si mismas la pérdida de colonias ni el despoblamiento de las colmenas.

Figura 32.-Árboles de decisión de las pérdidas y el despoblamiento, junto con sus curvas ROC.



El estudio de pérdidas de colonias de abejas y despoblamiento no se pudo realizar separado por años debido a la estructura del cuestionario y porque el número de muestras anuales no permitió obtener resultados significativos ni construir los

árboles de decisión del año 2011, ya que en ese año la mayoría de datos procedían de explotaciones con problemas patológicos.

7.3.2. Detección de plaguicidas

El equipo del Dr. Bernal (Univ. Valladolid) analizó plaguicidas en 100 muestras de polen pertenecientes al año 2010. Se escogieron 10 muestras al azar en cada una de las Comunidades Autónomas que participaron en este estudio y que contenían una cantidad de polen suficiente para su análisis.

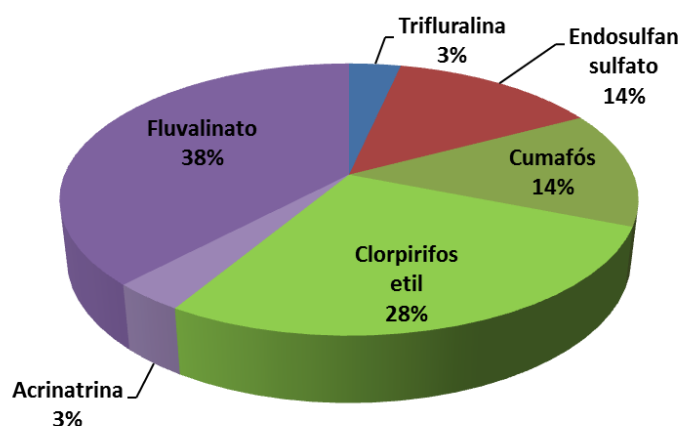
Los plaguicidas detectados se muestran en la Tabla 52 donde se puede ver a que familia pertenece cada compuesto.

Tabla 52.- Familia de plaguicidas a la que corresponde cada compuesto y el porcentaje de presencia de las distintas familias detectadas en 2010

Compuesto	Familia	%
Trifluralina	Dinitroanilinas	4
Endosulfán sulfato	Organoclorados	14
Clorpirifos etil	Organofosforados	41
Cumafós		
Fluvalinato	Piretroides	41
Acrinatrina		

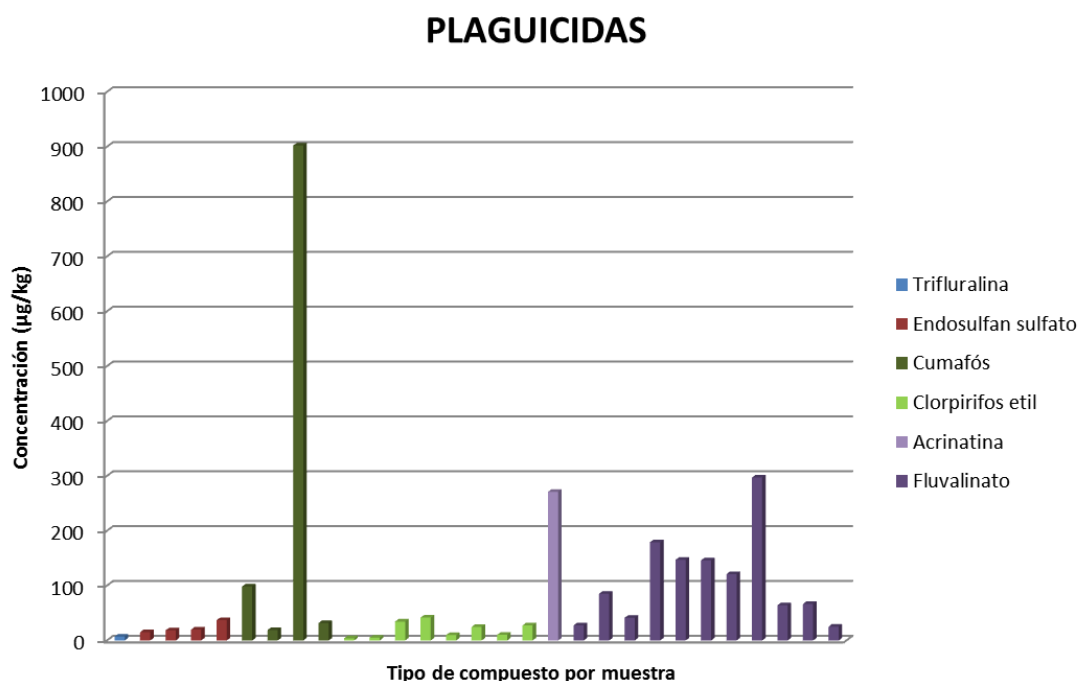
Solo el 21% de las muestras analizadas fueron positivas a seis tipos de compuestos diferentes. Los compuestos detectados fueron los siguientes: fluvalinato y acrinatrina (piretroides), cumafós y clorpirifos etil (organofosforados), endosulfan sulfato (organoclorado) y trifluralina (dinitroanilina). De todos ellos el más frecuentemente detectado fue el fluvalinato (Fig 33). En ningún caso se detectaron neonicotinoides entre las muestras positivas a algún compuesto.

Figura 33.- Porcentaje de los distintos compuestos encontrados en muestras de polen.



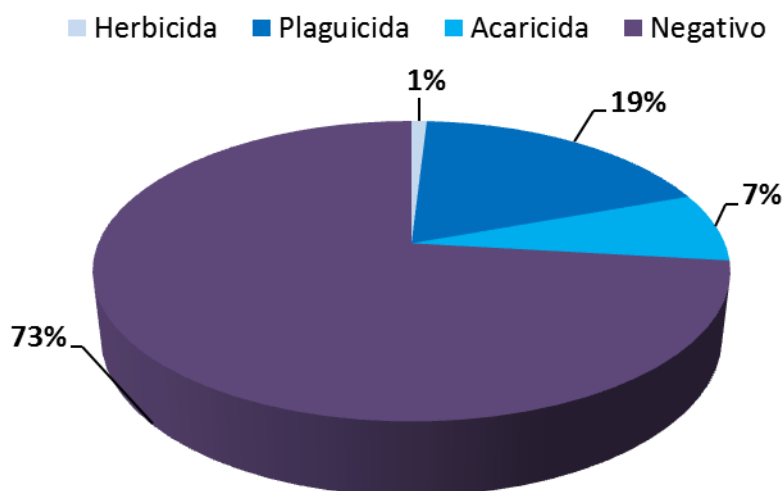
Aunque no fue el más frecuentemente detectado, el compuesto que presentó una mayor concentración en polen fue el cumafós (Fig 34).

Figura 34.- Muestras que resultaron positivas y los compuestos encontrados junto con su concentración.



La mayoría (19%) de compuestos detectados correspondían a plaguicidas aplicados por el apicultor, tan solo un 7% pertenecía a acaricidas empleados en los tratamientos contra la varroosis y un porcentaje minoritario (1%) correspondía a la presencia de herbicidas de uso agrícola (Fig 35).

Figura 35.- Diferentes usos de los compuestos detectados en polen.

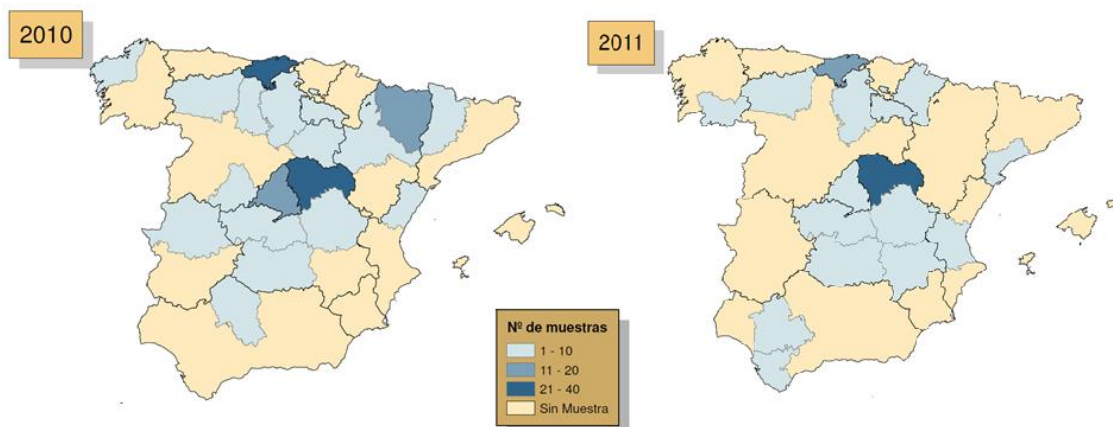


8. Capítulo 2: VIGILANCIA PASIVA

8.1. Tamaño muestral

En este apartado se describen los patógenos detectados en las muestras recibidas en el laboratorio de patología apícola durante los años 2010 y 2011. En la figura 36 se muestra el número de muestras de casos clínicos recibidas en el laboratorio de patología del CAR y divididas por provincias durante los años 2010 (132) y 2011 (77) respectivamente.

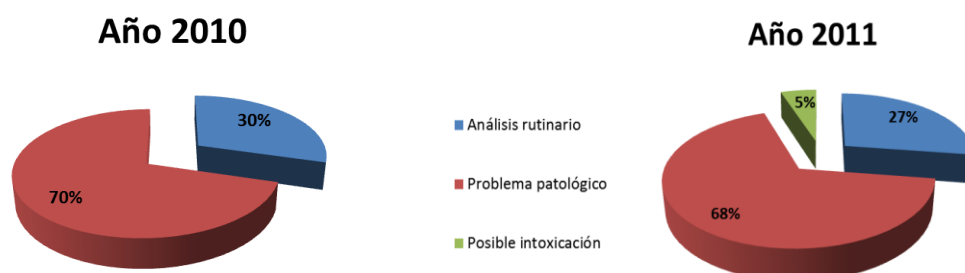
Figura 36.- Distribución del número de muestras recibidas a nivel de provincia en los años 2010 y 2011.



8.2. Motivos de remisión de muestras

En el siguiente gráfico (Fig 37) se representa la proporción de causas por las que fueron remitidas las muestras durante los años 2010 y 2011. Las muestras se agruparon principalmente en dos tipos, según si se remitieron al laboratorio por análisis rutinario o por sospecha de un problema patológico, ya que el tercer grupo formado por las muestras enviadas por una posible intoxicación de las abejas fue muy reducido. A pesar de que en el año 2011 el número de muestras recibidas se redujo casi a la mitad, los motivos por los que los apicultores mandaron las muestras se mantuvieron en la misma proporción que el año anterior (sin diferencias estadísticamente significativas $p > 0,05$).

Figura 37.- Proporción de muestras recibidas según la causa de remisión. Años 2010 y 2011.



La Tabla 53 representa la proporción de patógenos detectados en función de la causa de remisión de la muestra, cada uno de los años de estudio.

Tabla 53.- Causas de remisión de muestra y patógenos detectados. Años 2010 y 2011.

Patógenos detectados	2010		2011		
	Análisis rutinario	Problema patológico	Análisis rutinario	Problema patológico	Posible intoxicación
<i>Varroa destructor</i>	0	15,1	5,3	19,2	0
<i>Acarapis woodi</i>	2,6	2,2	0	0	0
<i>Nosema apis</i>	0	16,1	0	11,5	0
<i>Nosema ceranae</i>	2,6	82,8	0	73,1	0
Neogregarinos	0	9,7	0	4,3	0
Tripanosomátidos	5,1	19,4	0	13,5	50

Cuando el motivo del envío de la muestra fue la sospecha de un problema patológico, el patógeno más frecuentemente detectado en ambos años fue *N. ceranae*, seguido de los tripanosomátidos en 2010 y *V. destructor* en 2011. Mientras que el patógeno menos prevalente fue *A. woodi*, el cual ni siquiera fue detectado en 2011.

En cambio cuando la muestra fue remitida para la realización de un análisis rutinario, llama la atención el hecho de que en 2010 los tripanosomátidos fueran más detectados que *N. ceranae*, mientras que en 2011 *V. destructor* fue el único patógeno detectado. También sorprende el hecho de que los tripanosomátidos sean el único patógeno encontrado en aquellos casos del año 2011 en los que el apicultor sospechaba de una intoxicación en sus colmenares.

8.3. Prevalencias de los patógenos analizados

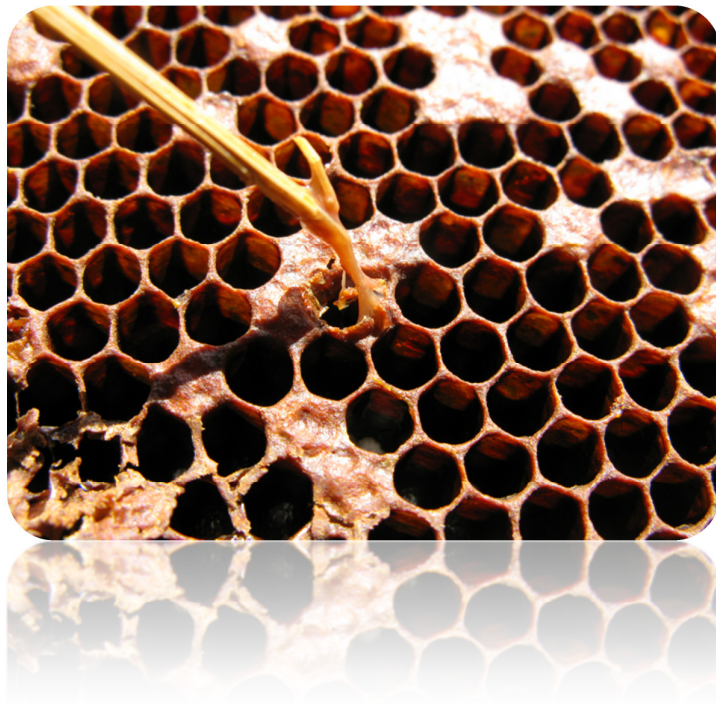
El valor de prevalencia anual para cada uno de los patógenos estudiados durante los años 2010 y 2011 se indica en la Tabla 54.

Tabla 54.- Prevalencias anuales del conjunto de todos los patógenos estudiados

Patógenos	2010			2011		
	Prevalencia (%)	IC (95%)		Prevalencia (%)	IC (95%)	
		Int.inf	Int.sup		Int.inf	Int.sup
<i>V. destructor</i>	10,6	5	16,2	15	6	23,3
<i>A. woodi</i>	2,3	0,5	6,5	0	0	4,7
<i>N. apis</i>	11,4	5,6	17,2	8	1	14,4
<i>N. ceranae</i>	59,1	50,3	67,9	49	38	61,2
Neogregarinos	6,8	2,1	11,5	3	0	9,7
Tripanosomátidos	15,2	8,7	21,6	12	4	19,5

El patógeno más prevalente durante los dos muestreos fue *N. ceranae*, seguido de los tripanosomátidos. Sin embargo, el patógeno menos detectado fue *A. woodi* en 2010 y los neogregarinos en 2011.

DISCUSIÓN



Para conocer los factores que intervienen en el incremento de la pérdida de colonias de abejas registrado en España, desde el Centro Apícola Regional se han desarrollado en los últimos años dos estudios epidemiológicos financiados con fondos nacionales de investigación (RTA 2005-00152 y RTA 2008-00020-C02-01). En el primer estudio se analizaron los factores, bióticos y abióticos, que afectan a las abejas melíferas para conocer el estado de salud de la cabaña apícola española (Garrido-Bailón, 2012). En dicho trabajo se concluyó que los patógenos de mayor prevalencia en las colmenas españolas fueron *V. destructor* y *N. ceranae*, por lo que se sugirió que ambos patógenos jugarían un papel clave en el fenómeno de despoblamiento que en esos años se producía en España. En cuanto a los insecticidas neonicotinoides, señalados por algunos autores como los agentes causales de este fenómeno (Decourtye y col., 2004; El Hassani y col., 2005; Chauzat y col., 2006; 2009), se detectaron en un bajo porcentaje (inferior al 1%) de las muestras de polen analizadas, lo que descartaría su papel central en la pérdida generalizada de colonias de abejas en España, resultado que está en la línea de los obtenidos por otros autores (Mullin y col., 2010; Bernal y col., 2011; Chauzat y col., 2011; Yañez y col., 2014).

El segundo estudio, el cual se presenta en esta memoria, se desarrolló con la finalidad de comprobar, si tres años después, los factores detectados en el primer estudio seguían siendo la principal causa que afecta a la viabilidad de las colonias de abejas, o si se había producido alguna variación en la prevalencia de los agentes nosógenos identificados en el primer estudio, o aparecían factores nuevos no estudiados hasta el momento. Para ello en este segundo estudio, se elaboró un programa de muestreo que permitiera detectar agentes nosógenos de baja prevalencia, se desarrollaron nuevas técnicas moleculares para la detección de patógenos no descritos hasta el momento en el territorio nacional y se actualizaron las técnicas analíticas utilizadas hasta el momento en el laboratorio.

El diagnóstico basado en el análisis del ADN ha experimentado un avance considerable en los últimos años, ya que permite la detección de patógenos de las abejas, en ausencia de síntomas de enfermedad, de una forma rápida y eficaz en comparación con las técnicas clásicas de diagnóstico (por ejemplo, observación macroscópica de ectoparásitos, observación microscópica de esporas de *Nosema*, aislamiento y cultivo microbiológico de bacterias). La técnica más empleada para el diagnóstico molecular es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante la cual se pueden detectar organismos de forma independiente o simultánea en una única reacción para un número elevado de muestras. Además este tipo de análisis es más sensible, pudiendo incluso detectar la presencia del agente cuando la carga parasitaria es muy baja (Martín-Hernández y col., 2007).

El sistema de monitorización descrito en la presente Tesis Doctoral es un segundo estudio epidemiológico realizado por el equipo de trabajo del CAR tras la tesis

de Garrido-Bailón (2012) y cuyo objetivo consiste en evaluar la prevalencia de agentes nosógenos, tanto bióticos (agentes patógenos e infecciosos) como abióticos (plaguicidas), que podrían estar relacionados con la pérdida de colonias de abejas. El trabajo realizado durante los años 2006 y 2007 (Garrido-Bailón, 2012) y que supone la base desde la que arranca esta tesis doctoral, nos ha permitido comparar los valores de prevalencia de los principales agentes nosógenos y su evolución en los últimos cinco años, así como poder detectar rápidamente la aparición de agentes exóticos invasores en nuestro país.

Para ello, durante los años 2010 y 2011 se estableció un sistema de vigilancia epidemiológica activa y pasiva sobre explotaciones apícolas de nuestro país.

9. VIGILANCIA ACTIVA

El sistema de vigilancia activa fue diseñado para conocer la magnitud y distribución de los agentes nosógenos que afectan a las abejas en España. Para tal fin, se ha realizado un estudio transversal compuesto por dos muestreos a nivel nacional, realizados durante la primavera de los años 2010 y 2011. En cada muestreo se recogieron muestras de abejas, cría, polen y fondo de colmena de seis colmenas elegidas al azar de cada explotación apícola participante en el estudio. Al muestrear varias colmenas de un mismo colmenar se aumentan las posibilidades de detectar la presencia de agentes nosógenos en las explotaciones, principalmente aquellos que presentan prevalencias muy bajas, y esto supone una mejora de la metodología utilizada por Garrido-Bailón (2012).

El nivel de participación de los apicultores fue suficiente para alcanzar un correcto nivel de significación de los datos obtenidos para cada agente nosógeno a nivel nacional, aunque no se pudo obtener muestras de las Comunidades Autónomas de Andalucía, Valencia y Cataluña. Dada la respuesta obtenida en las diferentes Comunidades Autónomas, se consideró inadecuado aportar datos a nivel de Comunidad Autónoma, por lo que se realizó el estudio a nivel nacional aportando resultados globales y distribución en los diferentes tipos de pisos bioclimáticos de nuestro país. Es destacable que de las Comunidades Autónomas de Murcia, Asturias y Canarias solamente se obtuvieron muestras en uno de los muestreos realizados lo que también podría sesgar los datos de prevalencia de los patógenos en algunas zonas bioclimáticas, junto con la ausencia de muestras procedentes de las zonas más cálidas de España, respecto a los datos aportados por Garrido-Bailón (2012). Efectivamente, en el estudio epidemiológico realizado por Garrido-Bailón (2012), se obtuvo un nivel de participación muy superior al nuestro, con un total de 1.957 muestras recibidas, en el que todas las Comunidades Autónomas participaron en al menos dos muestreos de los cuatro muestreos propuestos. En este estudio se trabajó con un total de 635 muestras entre los dos años de muestreo, pero el menor número de muestras

obtenidas en este caso no influye a la hora de comparar los resultados con el estudio de Garrido-Bailón (2012) puesto que se tomó como referencia el 40% de prevalencia establecido para *V. destructor* en el período 2006-2007, lo que redujo el tamaño muestral, con el fin de obtener un número de muestras más manejable a la hora de trabajar y que aporte datos de forma significativa. Se decidió hacer un solo muestreo en primavera por varias razones, en primer lugar porque en un estudio previo (Garrido-Bailón, 2012) se observó que los apicultores responden mejor en primavera que en otoño ya que prefieren no abrir sus colmenas en las épocas más frías. En segundo lugar, porque las diferencias en prevalencia entre los pisos bioclimáticos fueron mayores en primavera que en otoño (Garrido-Bailón, 2012). En último lugar, por la importancia a nivel económico ya que el coste de cuatro muestreos y sus correspondientes análisis era inasumible.

El tipo de explotación mayoritario del que se obtuvieron muestras en función del número de colmenas que lo conforman, fueron las explotaciones no profesionales (53% promedio de ambos años) las cuales presentaron un número de colmenas comprendido entre 16 y 150. Este tipo de apicultura no profesional se concentró en las Comunidades Autónomas de Galicia, Cantabria, País Vasco y Asturias. Al comparar este dato con el obtenido en 2006-2007 (34,6%), podemos decir que han participado más apicultores no profesionales en los muestreos realizados durante los años 2010 y 2011. Por otro lado, el estudio mostró que aquellos apicultores con colmenares de autoconsumo (menos de 16 colmenas) disminuyeron en su participación si se comparan los datos del período 2006-2007 (12,7%) con los del período 2010-2011 (8%). Esta menor participación también se detectó entre los apicultores que realizaron apicultura profesional (con más de 150 colmenas), puesto que su participación en este estudio fue de un 39% y, por el contrario, en el estudio realizado con anterioridad (Garrido-Bailón, 2012) se obtuvo un valor del 46,4%. El Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA), durante los años 2010 y 2011 refleja la existencia de una mayor cantidad de explotaciones no profesionales con respecto a las profesionales, y aunque los datos extraídos de este estudio no son completamente comparables con los obtenidos por el REGA (2012), se puede decir que los resultados obtenidos en los muestreos de los años 2010 y 2011 son representativos del sector apícola.

El tipo de colmena más empleado por los apicultores que participaron en el estudio fue la colmena Langstroth modelo “Perfección” (71,6% en 2010 y 63% en 2011) seguido de las colmenas Layens (36,11% en 2010 y 43,27% en 2011), Dadant (7,2% en 2010 y 13,09% en 2011) y Lusitana (0,72% sólo en 2011). Las colmenas tipo Perfección se emplearon con mayor frecuencia en Canarias, Asturias, Navarra, Cantabria y el País Vasco; por el contrario las colmenas Layens predominaron en las comunidades de Extremadura, Castilla-La Mancha, Aragón y Madrid. Al comparar estos datos con los recogidos en el estudio previo de Garrido-Bailón (2012), observamos en

nuestro caso una mayor participación de apicultores que manejan colmenas tipo Perfección (71,5% frente al 46,7%), y una participación similar de apicultores que manejan colmenas tipo Layens (alrededor del 43% en ambos estudios). También se reporta un incremento en la utilización de otros tipos de colmenas, como por ejemplo Dadant.

Respecto a la proporción de apicultores que realizan trashumancia, el porcentaje de éstos disminuyó desde un 44,7% entre los años 2006-2007 hasta un 31,65% en 2010-2011. Durante los años 2010 y 2011, la actividad trashumante se concentró en las comunidades de Extremadura, Castilla-La Mancha y Aragón, La Rioja y Castilla-León. En el estudio realizado por Garrido-Bailón (2012) se observó una mayor proporción de apicultores trashumantes en las comunidades de Aragón, Andalucía y Valencia. En el presente estudio, el hecho de no disponer de muestras de las dos últimas comunidades mencionadas, podría ser una explicación a la disminución observada en la actividad trashumante, ya que según datos del REGA (2012) se tratan de las zonas donde se desempeña una mayor actividad trashumante en España.

Al analizar los datos extraídos de las preguntas del cuestionario COLOSS incluido en la encuesta, se pudo concluir que tanto las pérdidas de colonias como el despoblamiento afectaron alrededor del 65% de los apicultores encuestados. Dichos valores se relacionan con las observaciones reales de campo, reportadas en diferentes trabajos y observadas en nuestro laboratorio (Higes y col., 2008c; 2009a; 2010a; e Higes, comunicación personal).

A la hora de hablar de mortalidad de colonias de abejas, para los apicultores es más fácil cuantificar una muerte que un despoblamiento. Debido a la falta de estandarización en los protocolos para definir cuando una colmena sufre despoblamiento los apicultores podrían confundir fácilmente una colmena débil con un despoblamiento. El componente subjetivo que aparece a la hora de decidir si una colmena presenta o no despoblamiento sin haberlo contrastado con medidas cuantificables para medir el vigor de las colonias, como por ejemplo el índice descrito por Bounias (1994), nos obligó a descartar los datos de la encuesta a cerca del número de colonias afectadas por despoblamiento. Los resultados obtenidos sobre pérdida de colonias de abejas en este estudio (10-25%) son ligeramente mayores que los descritos por el grupo EPILOBEE (2012-2013) de la Comisión Europea para España (10%).

En relación a los agentes nosógenos analizados, los patógenos se van a discutir en orden decreciente según los valores de prevalencias obtenidos para los parásitos de las abejas adultas y a continuación los agentes infecciosos de la cría.

Nosema ceranae, sin lugar a dudas, es el patógeno que presenta la mayor prevalencia de todos los detectados. Su prevalencia ha aumentado significativamente respecto a los valores aportados por Garrido-Bailón (2012) para nuestro país.

Efectivamente su prevalencia aumentó de valores del 44,9% en 2006 y 45,8% en 2007, hasta superar el 70%, tanto en 2010 como en 2011. En el caso de *N. apis* los valores de prevalencia detectados, también aumentaron ligeramente, pasando del 12,8% en 2006 y 9,4% en 2007 a un valor del 15,3% que permanece estable en los años 2010 y 2011. Según Lange (1996), valores de prevalencia del entorno del 15% de un microsporidio que parasita a un insecto, son compatibles con situaciones endémicas, en la relación del parásito con su hospedador. Por el contrario, la prevalencia detectada para *N. ceranae* sería compatible con una situación epidémica. Este aumento de la prevalencia detectado en los últimos cinco años, y los valores detectados en la actualidad, indicarían que el microsporidio está sufriendo una expansión poblacional reciente, como confirman en sus trabajos Gómez-Moracho y col. (2015), Jara y col. (2015) y Roudel y col. (2013).

Esta mayor prevalencia obtenida para *N. ceranae* en la vigilancia activa, guarda relación con la mayor prevalencia de este patógeno detectada en las muestras incluidas en la vigilancia pasiva.

En general, los resultados de este estudio apoyan el hecho de que *N. ceranae* es más prevalente que *N. apis*. Aunque las condiciones de muestreo ofrecen diferencias que no permiten equiparar adecuadamente todos los datos, los resultados obtenidos en estudios realizados en otros países son bastante parecidos: en colmenas trashumantes de Estados Unidos detectaron prevalencias de 75% para *N. ceranae* y menores del 25% para *N. apis* (Runckel y col., 2011), mientras que en un estudio realizado en julio de 2011 en Bélgica los valores de prevalencia obtenidos para estos patógenos fueron 92,6% y 10,2% respectivamente (Ravoet y col., 2013). En cambio, en China entre los años 2010 y 2011 detectaron una prevalencia del 45% para *N. ceranae* (Li y col., 2012), posiblemente debido a que las abejas analizadas pertenecían a la especie *A. cerana* para la cual *N. ceranae* no es un patógeno novedoso. En otras zonas del mundo, como Alemania, se ha detectado *N. apis* con mayor frecuencia que *N. ceranae* (Gisder y col., 2010).

Dado que ambas especies de microsporidios producen esporas morfológicamente similares, las cuales son difíciles de distinguir mediante observación microscópica, para diferenciar ambas especies en este estudio se utilizó la técnica de PCR diseñada por un miembro de nuestro equipo (Martín-Hernández y col., 2012). En este caso dicha técnica se ha mejorado, mediante el uso de placas de diagnóstico gelificadas que contienen todos los reactivos necesarios (cebadores y enzima) para realizar la PCR. Estos reactivos han sido previamente mezclados a una concentración óptima y posteriormente gelificados en cada vial por los laboratorios *Biotoools*. Así a la hora de manipular las placas antes de introducirlas en el termociclador, únicamente requieren la adición de agua y del ADN molde. La técnica de gelificación de los reactivos en las placas para la posterior PCR conlleva además, una serie de ventajas

como son, una mayor reproducibilidad de los análisis y una reducción de los errores de pipeteo, puesto que el tiempo de manipulación es mínimo, lo que a su vez reduce el riesgo de contaminación. El hecho de haber empleado en este estudio una enzima más sensible (*HotSplit DNA polymerasa*®, *Biotools*) que la utilizada previamente por Garrido-Bailón (*High Fidelity PCR Master*®, *Roche Diagnostics*) podría explicar la mayor prevalencia encontrada para ambas especies de microsporidios con respecto al estudio realizado durante el período 2006-2007, aunque también podrían intervenir otros factores como el análisis de seis colmenas por colmenar en lugar de una lo cual aumenta la probabilidad de detectar enfermedad en un colmenar o el menor número de explotaciones muestreadas en 2010 – 2011 o el hecho de que pudiera haber más casos de enfermedad en el período en que se realizaron los muestreos de este trabajo.

Acerca de las metodologías inapropiadas para la cuantificación de *N. ceranae*, varios autores (Higes y col., 2008c, 2013a; Meana y col., 2010; Goblirsch y col., 2013) demostraron que el recuento de esporas no es un método adecuado para estimar la carga parasitaria por *N. ceranae* en una colonia de abejas, aunque el método haya sido utilizado con frecuencia en varios estudios (Meixner y col., 2014; Rinderer y col., 2014).

En base a los datos obtenidos por Garrido-Bailón (2012) sobre la distribución de *N. ceranae* en los distintos pisos bioclimáticos, cada especie de microsporidio mostró una distribución diferente. Así entre los años 2006 y 2007, *N. apis* tendió a encontrarse más frecuentemente en las zonas con temperaturas frías o de clima más suave, lo cual apoya los resultados de este estudio ya que esta especie se situó en los pisos de clima supramediterráneo, mesomediterráneo y montano. La nula o escasa distribución de *N. apis* en los pisos colino y termomediterráneo respectivamente fue la esperada, puesto que *N. apis* no suele aparecer en lugares de climas extremos (Higes y col., 2010c; Martín-Hernández y col., 2012). Durante el período 2006-2007 *N. ceranae* se localizó principalmente en las zonas más cálidas, mientras que en los años 2010 y 2011 apareció con mayor frecuencia en los climas supramediterráneo y montañoso. Estos resultados no se contradicen con aquellos obtenidos con anterioridad por Garrido-Bailón (2012) y otros autores (Higes y col., 2006; Fries, 2010; Natsopoulou y col., 2015), en los que *N. ceranae* también apareció en los pisos de climas cálidos pero con menor prevalencia posiblemente debido a la menor cantidad de muestras recogidas en la zona sur del país. Aunque este microsporidio pueda aparecer en zonas más frías, varios estudios han demostrado que *N. ceranae* es más sensible a las bajas temperaturas (Gisder y col., 2010; Stevanovic y col., 2011; Hedtkle y col., 2011) que *N. apis* (Sánchez Collado y col., 2014). En este sentido, Forsgren y Fries (2013) ya demostraron que en el Norte de Europa *N. apis* es más prevalente que *N. ceranae*. La presencia de *N. ceranae* en todos los pisos bioclimáticos sugiere que puede adaptarse a desarrollar su ciclo biológico en cualquier tipo de ambiente, aunque es en las zonas cálidas donde presenta mayor prevalencia.

En algunas ocasiones la diferente distribución de ambas especies de microsporidios se explican en base a la interpretación de datos experimentales tales como el hecho de que *N. ceranae* podría estar desplazando a *N. apis*, mientras que los estudios realizados por Martín-Hernández (2012), al igual que Forsgren y Fries (2013), no mostraron el reemplazo de una especie por otra. En cambio, Natsopoulou y col. (2015) demostró la existencia de una competición interespecífica entre ambas especies a favor de *N. ceranae* que puede ser debida a la mayor virulencia provocada por parte de un patógeno exótico frente a un patógeno nativo sobre el mismo hospedador. La estabilidad de la prevalencia de *N. apis* sugiere que se trata de una especie endémica de España, mientras que *N. ceranae* refleja la introducción de un nuevo patógeno en Europa (Higes y col., 2006), que aún está modulando su patogenicidad, con una gran capacidad adaptativa la cual le ha permitido expandirse rápidamente durante los últimos años, facilitado además por la falta de un control adecuado de la enfermedad que produce (Higes y col., 2010b; Botías y col., 2012a).

Sobre la acción sinérgica entre *N. ceranae* y otros agentes patógenos Ravoet y col. (2013) demostraron que los efectos perjudiciales de *N. ceranae* pueden incrementarse cuando aparece en combinación con el tripanosomátido *Crithidia mellificae*. Al estudiar las posibles correlaciones existentes entre ambas especies de microsporidios con otros patógenos, nuestros resultados indicaron la existencia de una relación entre la presencia de *N. apis* en las muestras analizadas con una menor prevalencia de los virus del complejo ABPV-KBV-IAPV; mientras que la presencia de *N. ceranae* no mostró ninguna relación con los tripanosomátidos, *A. apis* ni con los virus como era de esperar, sino que curiosamente solo se observó correlacionado negativamente con *M. plutonius*.

Varroa destructor fue el segundo patógeno más detectado. La importancia de este ácaro radica en su capacidad para debilitar a las abejas, tanto a los adultos como a la cría, alimentándose de su hemolinfa y ejerciendo de vector de virus que afectan a las abejas como DWV y el complejo ABPV-KBV-IAPV (Francis y col., 2013a). Además, la varroosis es una de las enfermedades de declaración obligatoria a la UE según el RD 526/2014 y aparece incluida en las listas de la OIE (2015), también está sometida a un Programa Nacional de Control (RD608/2006). Este ácaro fue detectado en todas las explotaciones apícolas que participaron en el estudio, con la excepción de Murcia en el año 2010 donde la ausencia de este ácaro podría explicarse por el reducido número de colonias de abejas muestreadas en dicha región. Cabe destacar la alta prevalencia de este ácaro con respecto a los resultados obtenidos por Garrido-Bailón (2012).

Al comparar los valores de prevalencia de *V. destructor* obtenidos en este estudio y en el trabajo de Garrido-Bailón (2012) se observó un aumento en la prevalencia de este ácaro pasando de una prevalencia del 43,7% en 2006 a una prevalencia del 64% en el año 2011. Después de una década de la entrada en vigor del

RD 608/2006, en el que se declaró obligatorio el tratamiento de todas las colonias de abejas de España con un medicamento veterinario acaricida, registrado para uso apícola, durante el otoño y se subvencionó la adquisición de los productos acaricidas mediante las ayudas anuales aportadas por el Plan Apícola Nacional, nuestros datos sugieren que la parasitación por *V. destructor* dista mucho de estar bajo control, ya que hemos detectado tanto un mal uso en la aplicación de los medicamentos como un aumento constante de la prevalencia. Además, podríamos confirmar que no se está cumpliendo escrupulosamente lo citado en el real decreto en cuanto al uso de medicamentos acaricidas registrados en las colmenas. Si tenemos en cuenta que la cifra de ventas de medicamentos veterinarios registrados en 2011 (1.673.000 tratamientos vendidos) y el número de colmenas registradas en España en ese año (2.498.003 colmenas, MAGRAMA 2011), podríamos extrapolar que aproximadamente el 33% de las colonias de abejas en España no fueron tratadas con un medicamento veterinario como obliga la normativa.

Se han realizado una serie de estudios epidemiológicos en otros países (Al-Chzawi y col., 2009; Ravoet y col., 2013) utilizando diferentes metodologías de toma de muestras así como diferentes diseños epidemiológicos y técnicas analíticas, por lo que aunque los resultados obtenidos no serían totalmente comparables con los obtenidos en el presente estudio, también muestran un alto grado de detección de *V. destructor*. Por el contrario, otros que muestran una baja detección del ácaro pueden ser debidos a la utilización de colmenas tratadas con acaricidas (Runckel y col., 2011) o a estudios realizados sobre abejas de otra especie como *A. cerana* en China, la cual ha coevolucionado a lo largo de muchos años con este parásito originario de dicha zona (Li y col., 2012).

Efectivamente, este aumento detectado en los valores de prevalencia de *V. destructor* a lo largo del tiempo, sugiere que las medidas existentes para el control de varroa en nuestro país no están siendo totalmente efectivas, tal y como se mencionó previamente. Teniendo en cuenta que los apicultores disponen de una gran variedad de medicamentos veterinarios para luchar contra *V. destructor* y que desde el año 2006 existen ayudas económicas para combatir la varroosis concedidas a través del Plan Nacional Apícola (RD 608/2006), tan sólo un 30% de los apicultores participantes emplearon correctamente los medicamentos veterinarios aplicados a sus colmenas. Si extrapolamos al total de la cabaña apícola este dato y el porcentaje de colonias de abejas que no recibirían un tratamiento según se desprende de los datos de ventas de medicamentos para el control de la varroosis en España, podríamos sugerir que solamente el 20% de las colonias de abejas de nuestro país estarían siendo tratadas de manera adecuada, situación similar a la descrita por Garrido-Bailón (2012) para los años 2006 y 2007. Sin lugar a dudas, este hecho representa un riesgo sanitario de primera magnitud y muestra nuevamente la necesidad de profundizar en las campañas

de formación y concienciación del sector apícola y de los responsables sanitarios de las explotaciones de abejas melíferas.

Aun así, el haber realizado el tratamiento de una forma correcta o incorrecta no mostró diferencias significativas sobre los porcentajes de parasitación, al igual que tampoco se encontró ninguna relación entre la parasitación por *V. destructor* y el tipo de colmena utilizado por el apicultor. El hecho de no encontrar diferencias entre los resultados positivos y negativos a *V. destructor* en los colmenares tratados adecuadamente sugiere que los apicultores realizan más tratamientos que no declaran porque probablemente se emplean de forma artesanal medicamentos no autorizados.

En las encuestas realizadas acerca de los tratamientos utilizados en las colonias para el control de la varroosis, en el primer tratamiento el medicamento veterinario más empleado fue el Apivar®, seguido por Apistan®, CheckMite+® y Bayvarol®. Y como acaricidas autorizados en apicultura ecológica, los apicultores prefieren el Apiguard® al Ecoxal® ya que tienen un precio muy asequible y por ello los utilizan con mayor frecuencia para la realización del segundo tratamiento acaricida que no está subvencionado, aunque también han declarado el empleo ilegal del timol puro y el ácido oxálico para el tratamiento de sus colmenas. Un grupo minoritario de los encuestados declararon utilizar métodos biotécnicos, como el empleo de la cría de zánganos (0,6% en 2010 y 1,2% en 2011), para controlar el ácaro *V. destructor* en sus colonias de abejas. Alrededor del 8% de los participantes declararon haber empleado diversas sustancias no autorizadas para tratar sus colmenas e incluso un pequeño porcentaje de apicultores (0,2% en el primer tratamiento y 1,5% en el segundo) ni siquiera declararon con que producto trataban sus colmenas. Al comparar estos datos con el estudio previo (Garrido-Bailón, 2012) podemos observar cómo ha disminuido el uso de medicamentos de la familia de los piretroides (Apistan® y Bayvarol®) a favor del amitraz (Apivar®), así como ha aumentado la utilización de sustancias compatibles con la apicultura ecológica de forma individual o en combinación con los medicamentos veterinarios, y ha disminuido ligeramente el empleo de sustancias no autorizadas desde porcentajes del 13% en 2006-2007 hasta un 8% en 2010-2011.

En cuanto al segundo tratamiento, los medicamentos veterinarios se emplearon siguiendo el mismo orden de preferencia que en el primer tratamiento. Continuó dominando la utilización de amitraz (Apivar®), solo que los porcentajes se mostraron ligeramente reducidos y se observó un mayor aumento en la utilización de tratamientos ilegales con sustancias orgánicas como el timol y el ácido oxálico las cuales mostraron porcentajes de 18,45% y 5,5% respectivamente que habían doblado su uso en este segundo tratamiento. Esta diferencia puede ser debida a que sólo están subvencionados los medicamentos para el primer tratamiento, obligatorio por ley (RD 608/2006), mientras que se utilizan más sustancias orgánicas en el segundo tratamiento porque resultan más económicas para el apicultor. También aumentó la

utilización de cría de zánganos por parte de los apicultores (6 y 5%, en 2010 y 2011) y solo el 5% de los apicultores declaró haber utilizado sustancias no autorizadas. En el estudio realizado con anterioridad se reflejó la misma tendencia.

El empleo de tratamientos artesanales, unido a una incorrecta posología de los medicamentos veterinarios, puede favorecer la selección de varroas tolerantes a diferentes sustancias acaricidas (Higes y col., 1998; Mathieu y Faucon, 2000; Maggi y col., 2010; Strachecka y col., 2015) y la acumulación de residuos de plaguicidas en la cera (Chauzat y Faucon, 2007; Simon-Delso y col., 2014) e incluso producir el colapso de la colonia si el parásito no se controla adecuadamente (Rosenkranz y col., 2010). De hecho, ciertas investigaciones apoyan la hipótesis que *V. destructor* es uno de los patógenos que pueden estar más implicado en el síndrome de despoblamiento de las colmenas (Dainat y col., 2012; Francis y col., 2013a; Ravoet y col., 2013; Cox-Foster y col., 2007).

Al estudiar la distribución de *Varroa destructor*, este ácaro apareció en todos los pisos climáticos con altos valores de prevalencia, aunque el mayor número de muestras positivas se localizaron en los pisos bioclimáticos termomediterráneo y montano que presentan ambientes con condiciones climáticas muy diferentes. Todo ello demuestra una gran adaptabilidad de este parásito independientemente de las condiciones climáticas. Por el contrario, en el estudio realizado por Garrido-Bailón (2012) la distribución del ácaro presentó una mayor prevalencia en los pisos montano y supramediterráneo, tendiendo a concentrarse en las regiones más frías de España.

Respecto a su acción patógena, ésta depende de los distintos haplotipos que existen dentro de la especie *V. destructor*. En este estudio no se analizó el haplotipo de varroa puesto que no hay indicios que nos hagan pensar que el haplotipo coreano haya cambiado en base a los estudios existentes, los cuales demuestran que este haplotipo es el más extendido a nivel mundial (Muñoz y col., 2008; Maggi y col., 2012; Rasolofoarivao y col., 2013; Gajic y col., 2013).

En último lugar al analizar la relación de la presencia de varroa con la presencia en las mismas muestras del resto de patógenos incluidos en el estudio, se observó una relación significativa entre varroa y el virus DWV, como ya se indica en estudios previos (Francis y col., 2013a; 2013b; Ryabov y col., 2014).

Aunque los tripanosomátidos de abejas no han sido muy estudiados desde su descubrimiento (Langridge y McGhee, 1967), los estudios más recientes parecen indicar que podrían estar implicados en el fenómeno de despoblamiento de las colmenas (Ravoet y col., 2013). De hecho, en este trabajo se analizó su presencia mediante PCR (Meeus y col., 2010) y se obtuvieron valores de prevalencia bastante elevados y muy similares a *Nosema ceranae*, alcanzando un 68% de prevalencia de tripanosomátidos en 2010 mientras que dicho valor se redujo hasta un 38% en el

siguiente muestreo. Lo cual coincide con los valores de 70% de prevalencia detectados en las colonias de abejas en Bélgica (Ravoet y col., 2013) y los valores alrededor del 30% estimados por otros autores (Runckel y col., 2011; Li y col., 2012). Sin embargo, al estudiar la relación entre *N. ceranae* y los tripanosomátidos no se obtuvieron valores significativos que nos permitan confirmar dicha correlación.

Tras el empleo de la técnica de PCR (Meeus y col., 2010) para la detección de tripanosomátidos, las muestras de este estudio que fueron positivas para estos organismos fueron secuenciadas para comprobar si se trataba de la especie *C. mellifica*. Al analizar las secuencias genéticas obtenidas surgieron algunas incongruencias que indicaban la posibilidad de que se hubieran amplificado otros tripanosomátidos que no pertenecían a la especie *C. mellifica*, contrariamente a lo que se esperaba. Por ello, se realizaron nuevos análisis de PCR utilizando distintos cebadores que amplificaban diferentes regiones del genoma (gen 18S rDNA y locus GAPDH) y posteriormente dichas muestras fueron sometidas a un proceso de clonación, debido a que la secuenciación directa de los productos de PCR dio lugar a una secuencia promedio a partir de la mezcla de secuencias obtenida durante el proceso de amplificación. Las tres muestras seleccionadas mostraron varios haplotipos con niveles variables de diversidad en los distintos aislados. En general, el gen 18S rDNA (diversidad total de $\pi = 0,16 \pm 0,06\%$; media \pm SE) resultó ser menos variable que el locus GAPDH ($\pi = 0,40 \pm 0,14\%$), aunque la diferencia entre ambos loci no fue estadísticamente significativa. En paralelo se analizó una muestra de la cepa de referencia del tripanosomátido *C. mellifica* (ATCC30254), la cual también presentó múltiples haplotipos en el locus GAPDH, lo que refleja que esta cepa de referencia no es isogénica (Cepero y col., 2014a).

En primer lugar, la comparación por pares de las secuencias del gen 18S rDNA reveló que *C. mellifica* ATCC30254 (KJ704242 - KJ704251) contenía una única mutación que no estaba presente en las secuencias depositadas en *GenBank* de la presunta *C. mellifica* (KF607064.1 y AB745488.1) ni en las muestras seleccionadas (KJ704218 - KJ707241). Esta única diferencia entre la cepa de referencia (*C. mellifica* ATCC30254) y el resto de las secuencias es extremadamente importante ya que cualquier nucleótido que varíe en un marcador altamente conservado como el gen 18S rDNA, que muestra una fuerte identidad (aproximadamente 99%) entre los diferentes géneros (Cepero y col., 2014a), sugiere que *C. mellifica* ATCC30254 y nuestras secuencias (que son casi idénticas a las depositadas en *GenBank*) podrían representar organismos genéticamente aislados. De hecho, trabajos publicados recientemente de las cepas que presentan diferencias con respecto a *C. mellifica* las incluyen en un nuevo clado denominado *Lotmaria passim*, perteneciente a la subfamilia Leishmaniinae (Schwarz y col., 2015; Ravoet y col., 2015c).

En segundo lugar, el análisis de las distancias genéticas entre las secuencias del locus GAPDH mostró que *C. mellificae* ATCC30254 (KJ704273 - KJ704282) posee una divergencia de $6,89 \pm 1,32\%$ con respecto al resto de las secuencias, entre las que se incluyen las secuencias depositadas en *GenBank* para la presunta *C. mellificae* (AB716357.1, AB745489.1 y JF423199.1) y nuestras muestras (KJ704252 - KJ704272), que nuevamente eran muy parecidas a AB716357.1 y AB745489.1. Sin embargo, este hallazgo es aún más sorprendente si tenemos en cuenta que la divergencia total estimada, como la calculada en este estudio, subestiman la distancia genética neutral entre las secuencias (donde los sitios de sustitución representan casi el 75% de la secuencia codificante y su tasa de evolución se encuentra severamente limitada por la depuración de selección). Por lo tanto, para obtener una estimación más fiable de la divergencia se realizaron comparaciones por parejas en los sitios sinónimos, que se consideran neutrales o casi neutros. El resultado de este análisis fue que hay una gran distancia genética ($23,47 \pm 5,48\%$) entre *C. mellificae* ATCC30254, una cepa de referencia acreditada desde 1974, y el resto de las supuestas secuencias de *C. mellificae*. Este último grupo corresponde a un taxón altamente diferenciado que debería ser renombrado, lo cual unido a la gran dispersión de las secuencias del género *Crithidia* en todo el árbol cuestiona su actual clasificación taxonómica. Esto significa que nos encontramos ante la primera demostración de que en el campo hay otro tripanosomátido diferente a *C. mellificae* (Cepero y col., 2014a), el cual posteriormente ha sido denominado *Lotmaria passim* (Schwarz y col., 2015). Con respecto a esto, anteriormente se había mencionado la existencia de linajes de *C. mellificae* muy divergentes (Cornman y col., 2012).

La distribución de los tripanosomátidos presentó altos valores de prevalencia entre los distintos pisos climáticos, siendo menos frecuente en el piso supramediterráneo, lo que parece indicar que estos organismos no poseen preferencia por ningún clima determinado. Su aparición en diversos países como Australia (Langridge y McGhee, 1967), China (Yang y col., 2013), Francia (Dainat y col., 2012), Japón (Morimoto y col., 2013), Suiza (Schmid-Hempel y Tognazzo, 2010) y Estados Unidos (Runckel y col., 2011) parece mostrar una distribución cosmopolita, la cual confirman los resultados de este trabajo.

Aunque por el momento se desconoce el verdadero impacto de los tripanosomátidos sobre la salud de las abejas, su alta prevalencia y su vinculación con una mayor mortalidad invernal de las abejas (Ravoet y col., 2013), tanto solos, como asociados con *N. ceranae* (Runckel y col., 2011; Ravoet y col., 2013) hacen necesarios más estudios sobre estos organismos. Los resultados de este estudio revelan ciertas dificultades taxonómicas en la familia *Tripanosomatidae*, dado que el uso de un marcador altamente conservado como el gen 18S rDNA no es adecuado para clasificar los tripanosomátidos (Cepero y col., 2014a) que están infectando a las abejas melíferas, y por lo tanto, debe considerarse el uso de genes alternativos.

En los últimos años estos organismos han sido relacionados con la mortalidad de las abejas durante el invierno (Ravoet y col., 2013), y aunque todavía se desconoce si son capaces de producir algún efecto dañino sobre las abejas existen trabajos (Schwarz y Evans, 2013) que sugieren una acción patógena de estos organismos.

Otro grupo de agentes nosógenos incluido en esta memoria son los neogregarinos. Tradicionalmente se consideraba que estos agentes se detectaban exclusivamente en los abejorros (Rutrecht y Brown, 2008; Meeus y col., 2010), aunque cada vez hay más evidencias de que también pueden detectarse en las abejas melíferas (Plischuk y col., 2011; Maharramov y col., 2013; Morimoto y col., 2013). Sin embargo, la posible acción patógena que produce este protozoo en *Apis mellifera* aún no ha sido estudiada en profundidad. En el caso del presente estudio los neogregarinos han sido detectados con una prevalencia entre el 15-20%, similar al 14% de prevalencia detectado en Argentina en el año 2010 (Plischuk y col., 2011). Los neogregarinos muestran una prevalencia baja en comparación con otros patógenos de las abejas como los virus, *V. destructor* o *N. ceranae*, aunque se ha descrito que las abejas podrían actuar como reservorio o vector de dichos organismos (Meeus y col., 2011).

En cuanto a su clasificación filogenética, como en el caso de los tripanosomátidos, existen dificultades a la hora de clasificar taxonómicamente este grupo ya que el grupo filogenético al que pertenecen los neogregarinos (*Apicomplexa*) no está bien caracterizado (Leander, 2008), con el problema añadido de que en la actualidad no hay suficientes secuencias disponibles en *GenBank* de neogregarinos para establecer conclusiones fiables.

Respecto a su distribución, en nuestro estudio de vigilancia activa, detectamos muestras positivas a neogregarinos con una mayor prevalencia en el piso montano, aunque también fueron detectados en las áreas con clima colino y supramediterráneo; además mostraron una baja prevalencia en el piso mesomediterráneo y no fueron detectados en las zonas más cálidas (piso termomediterráneo). Estos datos sugieren que este tipo de organismos presentan una distribución con tendencia a concentrarse en las áreas de climas fríos, aunque también han sido detectados en muestras procedentes de colonias de abejas melíferas en Finlandia y Argentina que presentan climas tanto glaciares como tropicales (Lipa y Triggiani, 1996; Plischuk y col., 2011).

Acarapis woodi es un ácaro parásito de las abejas melíferas, siendo las tráqueas torácicas el lugar donde realiza su ciclo biológico y ejerce su acción patógena. Utilizando la técnica de PCR para detectar la presencia de *A. woodi* en las muestras de abejas adultas incluidas en el estudio, se obtuvo una prevalencia media del 8,3% en 2010 y 4% en 2011, lo que supondría un descenso en la misma, respecto al estudio previo realizado en el período 2006-2007 (Garrido-Bailón y col., 2012) que podría deberse al hecho de haber muestreado diferentes regiones en cada estudio. Otra

posible explicación podría ser el aumento del uso de cumafós para el tratamiento de la varroosis en el período en que se realizó el estudio actual, con respecto a la situación en el estudio anterior (Garrido-Bailón y col., 2012). Aunque no se han encontrado referencias en la literatura, es posible que el cumafós, como sustancia acaricida, tenga un efecto negativo en *Acarapis spp.* Este cambio en la prevalencia no puede estar relacionado con las diferentes técnicas empleadas, ya que la sensibilidad de la técnica utilizada para el diagnóstico se igualó a la del estudio anterior (Garrido-Bailón, 2012) mediante el ajuste de la concentración del cebador y la cantidad del ADN molde. Sin embargo, la prevalencia de *A. woodi* obtenida en este estudio es mayor que la prevalencia detectada en otros estudios (Yang y col., 2013; Ahn y col., 2015) que utilizan esta misma técnica para su diagnóstico, como por ejemplo, el equipo de Yang y col. (2013) detectó una sola colonia infestada por *A. woodi* en 17 apiarios estudiados de diferentes regiones de China.

Aunque se han propuesto diferentes métodos de PCR y diferentes parejas de pares de cebadores para detectar la infección por ácaros *A. woodi* (Evans y col., 2007; Kojima y col., 2011a; 2011b; Garrido-Bailón y col., 2012), hasta ahora sólo una pareja de cebadores parece haber conseguido amplificar específicamente esta especie (Kojima y col., 2011b).

En el presente trabajo de investigación nos propusimos desarrollar un nuevo método de PCR específico para este ácaro y que supusiera una mejora de los métodos desarrollados hasta el momento (Kojima y col., 2011b; Garrido-Bailón y col., 2012), mediante el diseño de una nueva pareja de cebadores diseñados sobre el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), pero en una zona mucho más específica para *A. woodi*.

Tradicionalmente se considera a *A. woodi* como una sola especie, en cambio el análisis filogenético de las muestras analizadas en este trabajo sugiere que podría tratarse de más de una especie. El análisis minucioso del electroferograma obtenido tras la secuenciación de los productos de PCR procedentes de las muestras positivas a este parásito, mediante el nuevo método de PCR puesto a punto, nos sugirió la posibilidad de que más de un haplotipo del parásito o incluso diferentes especies convivieran en la misma abeja parasitada. Por ello, decidimos investigar la naturaleza de algunas de las inconsistencias encontradas en el análisis de estas secuencias. La aplicación de la PCR y posterior clonación de los productos obtenidos, nos permitieron detectar variaciones genéticas diferentes dentro de un mismo aislado, incluso cuando aparecen a bajas frecuencias. Así pudimos descubrir que las muestras de abejas estaban frecuentemente coinfectadas con distintos haplotipos de ácaros *Acarapis spp.* Por lo tanto, los aislados que por secuenciación directa aparecían infectados sólo por *A. woodi* también presentaban un nuevo linaje (o linajes) de *Acarapis spp.* cuya presencia hubiera pasado desapercibida si no se hubiera realizado un estudio genético

de los clones obtenidos. Este hallazgo es muy importante, ya que demuestra la necesidad de profundizar en el estudio genético y morfológico de los agentes patógenos menos conocidos, ya que podríamos estar obviando variantes genéticas que pudieran presentar diferentes grados de virulencia para el hospedador. Es destacable que, ninguno de los recientes trabajos publicados (Kojima y col., 2011b, Yang y col., 2013; Shutler y col., 2014; Ahn y col., 2015; Budge y col., 2015) ha abordado este aspecto en su investigación, por lo que este trabajo aporta datos importantes y ya ha sido publicado (Cepero y col., 2015a). Cabe señalar que aunque la secuenciación directa representa la secuencia media de toda la población de productos de PCR, las secuencias del nuevo linaje/s parecían predominar cuando se realizó la clonación.

Que las secuencias “similares” a *A. woodi* representen una nueva especie o no, queda por determinar. La regla a seguir para diferenciar la diversidad intra e interespecífica es que la mayoría de las especies muestran menos del 2% de variación intraespecífica para el gen mitocondrial COI (la mayoría muestran menos de 1%: (Avice, 2000) y más del 4% de divergencia con su grupo más cercano (Mutanen y col., 2012)). Sin embargo, este criterio se refiere a la diversidad total, que incluye ambas variantes (sitios sinónimos y no sinónimos) en lugar de la diversidad sinónima estimada aquí como un predominio de la variación neutral. La divergencia total entre los clados *A. woodi* y *A. woodi*-“similar” es de 2,4%, se encuentra justo en el límite donde se puede discriminar entre las dos opciones, lo que impide una clara asignación de las secuencias a diferentes especies (Cepero y col., 2015a). En futuras investigaciones se realizarán más estudios para determinar si realmente estamos ante una nueva especie.

La distribución del parásito permaneció asociada a los pisos montano y supramediterráneo, caracterizados por un ambiente frío y húmedo. Por el contrario, en el estudio de Garrido-Bailón (2012) este ácaro presentó una mayor prevalencia en las zonas cálidas como Andalucía. Las distintas prevalencias obtenidas en el presente estudio podrían estar sesgadas por la falta de muestras correspondientes a las regiones más cálidas del país.

Generalmente es un patógeno al que, tanto las autoridades sanitarias, como el apicultor, no prestan atención y no suele ser objeto de estudio habitualmente. De hecho, en el último estudio Paneuropeo coordinado por el Laboratorio de Referencia Europeo para las Enfermedades de las abejas (EPILOBEE 2012-2013) no ha sido tenido en consideración. Sin embargo, se trata de un patógeno capaz de provocar importantes pérdidas en las colonias de abejas e incluso provocar el colapso de las colonias actuando de manera sinérgica con *V. destructor* (Downey y Winston, 2001). De otra parte se encuentra en la lista de patógenos de declaración obligatoria anual establecida por la OIE (2015).

Nuestro trabajo confirma la presencia de *A. woodi* en las colonias de abejas melíferas en España y la necesidad de vigilar su prevalencia y su papel como cofactor en los procesos relacionados con la pérdida de fuerza de las colonias de abejas como sugirió Kojima y col. (2011a) para Japón.

Existen otra serie de amenazas para las abejas como los daños que puede llegar a ocasionar la infestación producida por el pequeño escarabajo de las colmenas. Por ello, es importante establecer un control efectivo de las plagas y enfermedades que afectan a las abejas para mantener poblaciones de abejas melíferas con un buen estado sanitario que les permita realizar adecuadamente su función polinizadora y a la vez incrementar la producción de miel, contribuyendo así a los objetivos de seguridad alimentaria y biodiversidad a nivel nacional e internacional. Aunque en España no se ha descrito ni sospechado la presencia de *Aethina tumida*, la única manera de garantizar su ausencia es a través de estudios epidemiológicos que confirmen el estado libre de la plaga producida por este escarabajo (Cepero y col., 2014b). Por otra parte, España se trata de una zona susceptible de ser colonizada por el pequeño escarabajo de las colmenas, dado que comparte características climatológicas y biogeográficas con otros países donde el escarabajo ha sido capaz de establecerse. De hecho, la mayor parte de España presenta zonas ecológicas similares al sur de Italia en las cuales se informó de la presencia de *A. tumida* en septiembre de 2014 (Mutinelli y col., 2014).

El hecho de que el pequeño escarabajo de las colmenas haya logrado establecer poblaciones en muchos territorios de los Estados Unidos y Australia sugirió que el reconocimiento tardío de esta plaga en un área impide su erradicación (Neumann y Ellis, 2008) y apoya la necesidad de desarrollar sistemas de vigilancia en cada país. Por ejemplo, la identificación de esta plaga se informó dos años después de su introducción en Estados Unidos (Neumann y Ellis, 2008; Hood, 2004 citado por OIE, 2013b) y de 12 a 18 meses después de la primera alerta sospechada por parte de los apicultores en Australia (Neumann y Ellis, 2008).

A pesar de la realización exhaustiva de controles estrictos en las aduanas, el comercio ilegal de colonias de abejas puede conducir a la invasión de plagas o enfermedades exóticas dentro de un territorio. El sistema de vigilancia epidemiológica desarrollado en este trabajo podría ser útil para detectar la posible entrada de este patógeno en España en una etapa temprana de la invasión, lo que podría evitar su posterior expansión. A pesar de que el sistema de vigilancia fue diseñado dentro de un estudio más amplio para poder detectar otros patógenos, no sólo *Aethina tumida*, la tasa de precisión de este estudio posee una alta fiabilidad a la hora de detectar esta plaga. Por ello, se han analizado los restos del fondo de seis colmenas en cada apiario, distribuidas en zonas con un elevado censo de colonias. Todas las muestras analizadas fueron negativas, lo que confirma que España estaba libre de esta plaga durante los años de muestreo (Cepero y col., 2014b). Aunque se pidió la participación directa de

los servicios veterinarios en la toma de muestras, algunos apicultores realizaron la recogida de muestras en sus colmenares y esto podría sesgar la selección al azar de alguna manera. En cualquier caso, hay una probabilidad muy baja de que esto haya podido influir en los resultados sobre el estado libre de *A. tumida* en el país.

Este sistema de control permite procesar rápidamente un gran número de muestras, y de una forma económica y fiable. Acciones como la descrita son necesarias para proteger la actividad apícola mediante la detección precoz de plagas y enfermedades exóticas, así como la creación de medidas de control, regulación de plagas y enfermedades establecidas. Tras el reciente brote descubierto en Italia (Mutinelli y col., 2014), las medidas de seguimiento y control para la erradicación del parásito incluyen inspecciones en todos los colmenares en un radio de 20 km y en aquellos lugares donde se practica trashumancia. La implantación de un sistema de vigilancia en cada país, junto con el ajuste de la técnica de diagnóstico molecular (Ward y col., 2007) para una detección rápida y precisa podrían ayudar a limitar la propagación de esta plaga en las zonas controladas alrededor de los focos de infestación.

La salud de las abejas también puede verse comprometida por la actuación de distintos virus los cuales pueden poseer un material genético de tipo ADN o ARN, aunque la mayoría de ellos presentan ARN. A nivel de efecto patógeno, los virus han sido menos estudiados que otros patógenos de las abejas debido a que normalmente están presentes de forma asintomática en estos insectos.

Entre todos los virus que afectan a la especie *Apis mellifera*, en nuestro trabajo nos centramos en los virus más prevalentes en España como son BQCV y DWV, en base a los resultados obtenidos previamente por Garrido-Bailón y col. (2012).

En un estudio realizado en España entre los años 2003 y 2005 (Kukielka y col., 2008a) se obtuvieron unos valores de prevalencia para ambos virus que se aproximaban al 80%, siendo más prevalente DWV (79%) que BQCV (76%). En dicho trabajo, se desarrolló una pareja de cebadores específicos para amplificar DWV y BQCV mediante PCR cuantitativa, con unas temperaturas de fusión de 84,5 y 84°C respectivamente para cada virus. En un trabajo posterior (Antúnez y col., 2012b), se emplearon los cebadores descritos por Kukielka y col. (2008a) para analizar la prevalencia de estos virus en España, donde se obtuvo una prevalencia mayor de DWV (22,8%) con respecto a BQCV (13,7%) en 2006, mientras que la situación cambió en 2007 puesto que la prevalencia de BQCV (16,2%) fue mayor que la de DWV (11%). Al comienzo del estudio de estas investigaciones se utilizó la misma técnica empleada en los trabajos que se acaban de comentar y nos encontramos con dos problemas.

Por un lado, para conocer el estado del ARN en las muestras de 2006 y 2007 (Antúnez y col., 2012b) se utilizó la β -actina como control interno. Las muestras que

fueron positivas a β -actina indicaban que el ARN viral estaba en un buen estado de conservación y se seleccionaron para el análisis de los distintos virus individualmente por PCR cuantitativa con SYBR Green, mientras que las muestras que fueron negativas a β -actina se descartaron para el estudio. Al utilizar el mismo método para analizar las muestras de los años 2010 y 2011 se observó que algunas de las muestras que no fueron positivas a β -actina si mostraban resultados positivos para uno o varios de los virus estudiados. Así queda demostrado que la β -actina no es un buen control interno, ya que se degrada antes que el ARN viral y no refleja el correcto estado de las muestras para su posterior análisis. A su vez, esto explicaría el hecho de que las prevalencias detectadas fueran mucho más bajas en 2006 y 2007 puesto que solo se analizaron aquellas muestras positivas a β -actina. Si se hubiesen analizado todas las muestras es posible que la prevalencia de los virus DWV y BQCV se hubiera incrementado en 2006 y 2007.

Por otro lado, al analizar los resultados se observó la aparición de varios picos en las curvas de fusión asociados a distintas temperaturas de fusión en las muestras positivas a DWV, estas muestras se secuenciaron y su análisis reveló que los cebadores descritos para la amplificación de DWV con SYBR Green (Kukielka y col., 2008a) no son específicos porque además de este virus también amplificaron el virus *Varroa destructor* 1 (VDV-1) y el virus Kakugo (KV), los cuales están estrechamente relacionados con DWV y forman el complejo “DWV/VDV-1/KV” (Terio y col., 2008; Zioni y col., 2011; De Miranda y col., 2013) ya que al alinear sus secuencias son prácticamente indistinguibles unos de otros. Como consecuencia de este hallazgo, en este trabajo se modificó la temperatura a la que se obtienen las curvas de fusión para este virus, estableciendo que las curvas de fusión con temperaturas comprendidas entre 80,5 y 84°C corresponden a muestras positivas de este complejo de virus. Las secuencias positivas a BQCV también presentaron curvas de fusión con temperaturas diferentes a la temperatura esperada (84°C) para este virus, en este caso el análisis y secuenciación de estas muestras confirmó que las temperaturas de fusión comprendidos entre 81,5 y 83°C correspondían a muestras positivas a BQCV. En base a la falta de especificidad de los cebadores descritos previamente (Kukielka y col., 2008a) para la detección de DWV y BQCV, las altas prevalencias obtenidas para estos virus (alrededor del 80%) en los años 2003 y 2005 podrían estar sobrevaloradas dando falsos positivos.

En consecuencia a los problemas encontrados durante el diagnóstico de DWV y BQCV, en el presente estudio, se empleó la técnica de PCR cuantitativa con sondas TaqMan y además se realizó un estudio de estos dos virus en un total de 100 muestras escogidas al azar para comprobar la existencia de posibles diferencias entre ambas técnicas de PCR cuantitativa (con sondas TaqMan y con SYBR Green) a nivel de sensibilidad o especificidad. La comparación entre las dos técnicas demostró que el empleo de sondas presenta mayor sensibilidad que el uso de SYBR Green a la hora de

detectar BQCV, sin embargo para la detección de DWV la técnica de SYBR Green fue ligeramente más sensible que las sondas. En ambos casos, los cebadores empleados con sondas TaqMan fueron más específicos que los utilizados con la metodología SYBR Green.

La prevalencia de DWV presentó valores próximos al 50%. La importancia de este virus radica en su asociación con *V. destructor*, la cual ha sido demostrada por numerosos autores (Francis y col., 2013a; Ryabov y col., 2014; Erban y col., 2015) y ha sido confirmada en este estudio de asociación de patógenos, así como en su capacidad para replicarse tanto en el ácaro como en la abeja y su posible intervención en el aumento de la mortalidad de las colonias de abejas (Budge y col., 2015). Respecto a su distribución en los distintos pisos climáticos, DWV fue detectado con mayor prevalencia y con significación estadística en el estrato colino, por lo tanto la ubicación de este virus justifica la alta prevalencia encontrada en Galicia por Garrido-Bailón (2012) al compararla con otros trabajos (Antúnez y col., 2012b), además de que su distribución no depende de las condiciones ambientales.

Los resultados muestran que BQCV fue el virus más prevalente a lo largo de todo el estudio, el cual apareció distribuido por todos los pisos climáticos con altos valores de prevalencia y principalmente concentrándose en el piso supramediterráneo lo cual no se corresponde con otros estudios en los que asociaban la presencia de este virus a las zonas sur y este del territorio español (Kukielka y col., 2008b) posiblemente debido a la falta de muestras del sur del país en nuestro estudio. Al estudiar las posibles relaciones entre patógenos en este estudio no se encontró ninguna asociación entre BQCV y *N. apis* como se indicó en trabajos anteriores (Higes y col., 2007b), sin embargo se observó una correlación negativa entre dicho virus y *V. destructor*.

Entre los virus analizados se estudió otro complejo de virus altamente relacionados, descrito por De Miranda y col. (2010), constituido por los virus ABPV, KBV e IAPV. El virus IAPV es uno de los más relevantes ya que en algunas ocasiones ha sido relacionado con el síndrome de despoblamiento de las colmenas (Cox-Foster y col., 2007), aunque un trabajo realizado por Garrido-Bailón y col. (2010) no demostró ninguna relación entre este virus y la alta mortalidad de abejas durante el invierno en Francia y los resultados de este estudio tampoco apoyan esa asociación debido a la baja prevalencia encontrada. Respecto a la virulencia, KBV es el virus más patógeno de los tres, aunque ABPV es el virus más común que se encuentra infectando a las abejas (De Miranda y col., 2010). Estos tres virus fueron analizados a la vez en una sola reacción de PCR desarrollada por Francis y Kryger (2012), lo cual ahorra tiempo y costes pero no permite comparar los resultados obtenidos con los de otros grupos ya que utilizan una técnica diferente para detectar estos virus individualmente. En general, la prevalencia de los tres virus en conjunto es baja para ambos años de muestreo donde no alcanza valores del 10%. La reducida cantidad de la muestra de

partida no permitió realizar el estudio individual de los tres virus para conocer sus prevalencias por separado. Las muestras positivas fueron secuenciadas para intentar diferenciarlas aunque esto no fue posible ya que la zona de amplificación estaba muy conservada en los tres virus. Al estudiar la distribución del complejo ABPV-KBV-IAPV se encontró con mayor prevalencia en el piso montano y no hay registros de su presencia en el termomediterráneo durante el tiempo que duró el estudio. El estudio estadístico de las asociaciones entre patógenos mostró una correlación negativa entre este complejo de virus y *N. apis*.

Por último, los virus LSV 1 y LSV 2 deben su nombre a que fueron descubiertos en unas colmenas colocadas cerca del lago Sinai al Sur de Dakota, EEUU (Runckel y col., 2011), aunque posteriormente se han descubierto más cepas de este virus (Ravoet y col., 2013; 2015b). En este estudio LSV fue el virus menos prevalente, con valores que se redujeron en 2011 (0,4%) con respecto al 2010 (2,2%), y a pesar de su reducida prevalencia otro grupo de investigadores han detectado su presencia en España (Granberg y col., 2013) y recientemente en Turkia (Tozcar y col., 2015). Este virus ha mostrado prevalencias más altas, comprendidas entre un 15-30%, en otros países como Bélgica (Ravoet y col., 2013; 2015a). Sin embargo, en España al hacer el análisis por pisos climáticos no se ha encontrado presencia del virus en los climas más fríos (montano y colino). Aunque las prevalencias en el resto de pisos fueron muy bajas, alrededor del 1%, se concentró principalmente en el piso más cálido (termomediterráneo) con casi un 4% de prevalencia. Los últimos estudios revelan la presencia de este virus junto con BQCV y *N. ceranae* en colonias de abejas debilitadas (Daugenhenbaugh y col., 2015), indicando que podría estar implicado en la pérdida de colonias de abejas ya que se desconoce su efecto sobre la salud de las abejas.

A continuación, nos centraremos en los agentes patógenos que afectan a la cría de abejas (*A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*), dado que dos de ellos aparecen registrados en las listas de la OIE (2015) por producir las enfermedades infecciosas de la loque americana (*P. larvae*) y la loque europea (*M. plutonius*). A pesar del origen fúngico de la ascosferosis, y a diferencia del origen bacteriano de las loques, y las pérdidas económicas que provoca dicha enfermedad, no está sometida a ningún tipo de regulación nacional ni europea.

Para la detección de los agentes etiológicos de la ascosferosis, loque americana y loque europea se utilizó una PCR múltiple (Garrido-Bailón y col., 2013) capaz de detectar en una única reacción a estos patógenos de manera independiente o en coinfección en las colonias de abejas, incluso cuando la enfermedad se presenta de forma asintomática. Esta técnica fue elegida porque no requiere el aislamiento y cultivo puro de *A. apis* (James y Skinner, 2005; Murray y col., 2005) o *P. larvae* (Dobbelaere y col., 2001b; Lauro y col., 2003), ni la pre-incubación de larvas enfermas

en el caso de *Melissococcus plutonius* (Govan y col., 1998) lo cual facilita su diagnóstico.

En general, los resultados obtenidos revelaron una baja prevalencia de los agentes nosógenos de tipo infeccioso de la cría de abejas en España durante los años 2010 y 2011. En primer lugar, el valor de la prevalencia de *A. apis* varió entre el 4 y 5% a lo largo de ambos períodos de muestreo (2010 y 2011); en segundo lugar, *M. plutonius* mostró una prevalencia muy variable en los distintos años de muestreo con valores cercanos al 1% en 2010 hasta superar el 3% en 2011; mientras que en último lugar la prevalencia de *P. larvae* se mantuvo alrededor del 1% a lo largo de los dos años de estudio.

Al comparar los resultados obtenidos con los recabados por Garrido-Bailón (2012) se observa un leve incremento en la prevalencia de *A. apis* desde los años 2006 y 2007, donde no alcanzó en ningún momento valores mayores de 4,5%, hasta el año 2010 donde superó el valor de 5% destacando el hecho de que su prevalencia en el año 2011 descendió hasta un 4%. En cambio, ambos estudios realizados en España muestran prevalencias para *A. apis* más bajas que las registradas en otros países, como Japón (24,1%: Yoshiyama y Kimura, 2011).

A diferencia de la preferencia que mostró *A. apis* hacia zonas más calientes (pisos meso y termomediterráneo) durante el estudio realizado en el período 2006-2007 (Garrido-Bailón, 2012), la cual fue totalmente inesperada puesto que las características climáticas de dichas áreas no se consideran propicias para el crecimiento de este hongo, nuestros resultados muestran una mayor prevalencia de este patógeno en los pisos colino y supramediterráneo, aunque también apareció en zonas de ambiente más cálido. Sin embargo, estos resultados se ajustan mejor a la distribución esperada del hongo *A. apis*, que suele presentarse asociado a condiciones de alta humedad y temperaturas ligeramente frías (Flores y col., 1996; Borum y Ulgen, 2008). De hecho, se ha demostrado que el calentamiento artificial de la colmena en primavera reduce la incidencia de esta enfermedad (Pederson, 1976 citado por Garrido-Bailón y col., 2013). Además de los factores climáticos, las diferentes cepas de hongos y la variabilidad genética de las abejas también pueden influir en la incidencia y severidad de la enfermedad (Aronstein y Murray, 2010), llegando a ser una posible causa de su baja prevalencia en España. Incluso la elevada prevalencia de *Nosema ceranae* detectada en España (Martín-Hernández y col., 2012; Botías y col., 2012a; Cepero y col., 2014a) en relación al estrés causado en las colonias de abejas puede ser responsable de los brotes de enfermedades como en el caso de la ascosferosis (Hedtke y col., 2011), aunque esta relación no se confirmó al realizar el estudio de la asociación entre *N. ceranae* y *A. apis*.

Tras la primera detección molecular de *M. plutonius* en España, con valores casi despreciables desde 0,4% a 0,1% durante los años 2006 y 2007 respectivamente,

limitados a localizaciones puntuales en las zonas de climas más suaves (Garrido-Bailón y col, 2013). En estos estudios se ha observado un aumento de la prevalencia de este patógeno desde un valor de 0,8% obtenido en 2010, hasta un valor de 3,3% calculado en 2011. Todos los resultados positivos aparecieron en las Islas Baleares en ambos años de muestreo salvo una muestra positiva situada en Extremadura en el año 2011. Por lo que podríamos considerar a *M. plutonius* como un endemismo de las Islas Baleares, donde sería aconsejable empezar a implantar medidas de control de la enfermedad. Dicho patógeno solo apareció en ambientes levemente más cálidos durante el período de estudio 2010-2011 (pisos termomediterráneo y mesomediterráneo) en comparación con los años 2006-2007 (supramediterráneo y mesomediterráneo). Dicho lo anterior, en otros países europeos mediante el uso de técnicas de diagnóstico molecular han confirmado que la loque europea se trata de una enfermedad endémica, como por ejemplo en Suiza (Forsgren y col., 2005; Roetschi y col., 2008) y el Reino Unido (Budge y col., 2010).

La presencia de *P. larvae* supone una gran amenaza para las abejas, puesto que la infección que produce es altamente contagiosa (Hansen y Brødsgaard, 1999) y ocasiona un drástico descenso en el número de colonias afectadas (Genersch, 2010). La enfermedad causada por esta bacteria (loque americana) suele avanzar gradualmente en las colonias infectadas, llegando a producirles la muerte en pocos meses o después de varios años (Hansen y Brødsgaard, 1999; Genersch, 2010), y es capaz de manifestarse en cualquier momento del año aunque suele aparecer asociada a desequilibrios en la colmena. En contraste con lo anterior, nuestros resultados muestran una prevalencia muy baja de *P. larvae* en España durante el período estudiado (ligemente superior al 1% en 2010 y 2011), con una mayor prevalencia en el piso climático colino, caracterizado por un alto grado de humedad y temperaturas suaves durante el invierno. Estos resultados coinciden totalmente con los obtenidos en el año 2006 en España (Garrido-Bailón, 2012), si bien difieren bastante con la prevalencia del 3,7% detectada en 2007 para *P. larvae*.

La detección de agentes patógenos infecciosos en muestras de cría asintomáticas demuestra claramente que no se encuentran exclusivamente en las larvas que presentan signos clínicos de enfermedad (Forsgren y col., 2005; Belloy y col., 2007). La presencia de estas bacterias en muestras de crías aparentemente sanas apoya el hecho de que las larvas infectadas pueden sobrevivir y alcanzar la edad adulta conteniendo las bacterias en su interior (Bailey y Ball, 1991). Por otro lado, la salud de las larvas está estrechamente relacionada con el buen comportamiento higiénico de las obreras (Waite y col., 2003), a pesar de que las abejas nodrizas pueden actuar a la vez como vectores de estos agentes patógenos (Belloy y col., 2007; Roetschi y col., 2008) debido a su contacto con las crías infectadas y a su papel en la limpieza de las celdillas (Roetschi y col., 2008). Sin embargo, en general nuestros datos sugieren que las enfermedades de la cría pueden aparecer de manera secundaria aprovechando el

efecto patógeno de otro agente, como es el caso de *N. ceranae* (Martín-Hernández y col., 2012) que favorece la aparición de ascosferosis al debilitar la inmunidad social de la colonia de abejas (Yang y Cox-Foster, 2005; Antúnez y col., 2009) y darse las temperaturas que el hongo requiere para su multiplicación.

Al analizar los datos de mortalidad de colonias, se utilizó el test estadístico Chi-cuadrado para ver si había alguna relación de forma independiente entre los distintos patógenos analizados en este estudio y la pérdida de colmenas. El dato que mostró una mayor significación estadística fue la relación entre una mayor pérdida de colonias cuando había presencia de tripanosomátidos y, dado que este resultado es sorprendente requiere de estudios posteriores para su confirmación como causa o casualidad. Hasta entonces, lo único que explicaría la pérdida de colonias sería la presencia de los microsporidios del género *Nosema*, tanto *N. apis* como *N. ceranae*; estos datos concuerdan con el 53,5% de pérdidas en un estudio realizado en 2008 (Garrido-Bailón, 2012) donde la gran mayoría de apicultores (98%) declaró no haber utilizado fumagilina para el tratamiento de las colmenas frente a *Nosema* y por ello, la ausencia de medidas de control sobre estos microsporidios podría haber facilitado su expansión en años posteriores y a su vez explicaría el aumento del porcentaje de pérdidas. Este estudio proporciona una mayor robustez estadística al compararlo con el estudio realizado en 2008, ya que se ha empleado un mayor número de muestras (601 en 2010-2011 y 99 en 2008).

Resulta curioso que la presencia de varroa, patógeno que afecta a las abejas a nivel mundial, no presente valores significativos para explicar la pérdida de colonias, aunque podría ser debido a que la mayoría de los apicultores tratan sus colmenas, más o menos correctamente, y no se trata de una parasitosis sin control, además del hecho que una colmena debe estar gravemente parasitada por este ácaro para que produzca la muerte de la colonia y mucho antes el apicultor habrá tomado medidas.

A la hora de analizar los patógenos que pudieran intervenir en el despoblamiento de colonias, los resultados obtenidos indican que los tripanosomátidos y BQCV serían los patógenos más influyentes. Aún se desconoce el verdadero papel de los tripanosomátidos en las colonias de abejas y, además hay que recordar que BQCV es un virus que solo afecta a la reina y al morir ésta, si no es reemplazada, daría lugar a una colonia zanganera pero no conduciría a la muerte de la colmena. Tal y como se ha comentado anteriormente, diferenciar una colonia de abejas débil de una que sufre despoblamiento resulta complicado para el apicultor y, por tanto, no es de extrañar que las asociaciones estadísticas con los tripanosomátidos y BQCV obtenidas para explicar el despoblamiento no parezcan lógicas con los conocimientos actuales.

En base al estudio de plaguicidas en polen tan solo un 21% de las muestras estudiadas en 2010 mostró la existencia de algún tipo de plaguicida. Este bajo porcentaje no demuestra que los plaguicidas puedan ser la causa principal de la

muerte de las abejas en nuestro país tal y como se cita en algunos trabajos (VanEngelsdorp y col., 2009; VanEngelsdorp y Meixner, 2010).

En este trabajo se detectaron seis tipos diferentes de compuestos, de los cuales la sustancia mayoritaria fue el fluvalinato. Se trata de un compuesto químico clasificado como tóxico para las abejas, por ello se prohibió su utilización como producto fitosanitario en el tratamiento de semillas de girasol y maíz. También es el principio activo del Apistan®, que es un acaricida utilizado en el tratamiento de la varroosis, y algunos estudios han demostrado el desarrollo de resistencias por parte de los ácaros a dicha sustancia (Colin y col., 1997; Higes y col., 1998; Elzen y col., 2000).

Después del fluvalinato los siguientes compuestos más prevalentes fueron el clorpirifos etil (28%) y el cumafós (14%), ambos pertenecientes a la familia de los organofosforados. El clorpirifos está considerado como altamente tóxico para las abejas (Dauterman y O'Brien, 1964; Bendahou y col., 1997 citado por Pettis y col., 2012), y al igual que el fluvalinato su uso como tratamiento acaricida en abejas no está recomendado por eso la presencia de ambas sustancias en las muestras de polen es una consecuencia de la aplicación de tratamientos artesanales no registrados para el control de *V. destructor*. De hecho, se han realizado muy pocos estudios sobre el clorpirifos en los últimos años. No resulta extraña la presencia de cumafós en las muestras analizadas ya que constituye el principio activo del CheckMite+, que es un medicamento veterinario autorizado para el control de la varroosis. Lo que sí llama la atención es la elevada concentración (902 µg/kg) hallada en una de las muestras del estudio, cuya dosis podría resultar dañina para la salud de las abejas.

En un 14% de las muestras se encontró endosulfán sulfato, que se trata de un plaguicida perteneciente a la familia de los organoclorados. Y de forma minoritaria se encontraron dos tipos más de sustancias, que son, por un lado, la acrinatrina que es un plaguicida de la familia de los piretroides (como el fluvalinato), y, por otro lado, la trifluralina que es una nitrosamina empleada como herbicida en agricultura.

No se detectó en ningún caso compuestos neonicotinoides, como por ejemplo la imidacloprida que fue prohibida en 2013 (Reglamento (UE) Nº 485/2013) debido a que varios estudios demostraron que este tipo de plaguicidas resultaron ser altamente tóxicos para las abejas (Desneux y col., 2007; Belzunces y col., 2012), incluso llegando a debilitar su salud (Alburaki y col., 2015). De hecho, los datos publicados muestran que otros acaricidas y herbicidas fueron más prevalentes en las colmenas que los neonicotinoides o fenilpirazoles (Bernal y col., 2010, 2011; Johnson y col., 2010; Mullin y col., 2010; Lambert y col., 2013; Pettis y col., 2013). Por lo tanto, nuestros resultados como otros estudios (Rainer y Gill, 2015) confirman que las abejas no presentan preferencia por las plantas que han sido tratadas con neonicotinoides como se ha descrito recientemente (Kessler y col., 2015).

10. VIGILANCIA PASIVA

La última parte de este trabajo se compone del desarrollo de un sistema de vigilancia pasiva, el cual es un método adecuado para la detección de la incidencia de los principales patógenos de las abejas. Como en este caso el tamaño muestral fue bastante reducido en ambos años de estudio, estos resultados deben ser contrastados con los obtenidos en la vigilancia activa.

La mayoría de las muestras fueron remitidas al laboratorio por problemas patológicos cuando los apicultores detectaban alguna anomalía en sus colonias de abejas, y el resto de muestras fueron remitidas al laboratorio para la realización de análisis rutinarios para conocer el estado sanitario de sus explotaciones apícolas. En el año 2011 también se recibió un porcentaje muy pequeño de muestras para el análisis de una posible intoxicación.

Debido a su mayor prevalencia *N. ceranae* es el patógeno más prevalente en las colonias analizadas en el presente estudio (Cepero y col., 2015b), lo cual concuerda con otros estudios realizados en España (Martín-Hernández y col., 2012; Garrido-Bailón, 2012) y con los resultados obtenidos en el capítulo de vigilancia activa. Este patógeno fue el más frecuentemente detectado en los colmenares que se estudiaron con sospechas de presentar algún problema patológico con respecto a las muestras que fueron recibidas en el laboratorio para su análisis rutinario.

Curiosamente, la prevalencia obtenida para los tripanosomátidos fue mayor que para el ácaro varroa en el año 2010, mientras que su prevalencia disminuyó levemente en 2011. Como era de esperar la prevalencia de los neogregarinos fue bastante baja a lo largo de todo el estudio. Aunque el verdadero impacto de estos organismos en la salud de las abejas sigue siendo incierto, los resultados sobre los tripanosomátidos podrían apoyar a ciertos estudios que han vinculado su presencia en las colonias de abejas con la presencia de *N. ceranae* (Ravoet y col., 2013; Runckel y col., 2011). En relación a las causas de remisión de las muestras, los neogregarinos no fueron hallados en ninguna de las muestras enviadas para la realización de análisis rutinario, y los tripanosomátidos se encontraron en todas las muestras, salvo en las muestras analizadas de rutina en el año 2011. Los tripanosomátidos fueron el único organismo detectado en los casos recibidos para el estudio de una posible intoxicación en 2011.

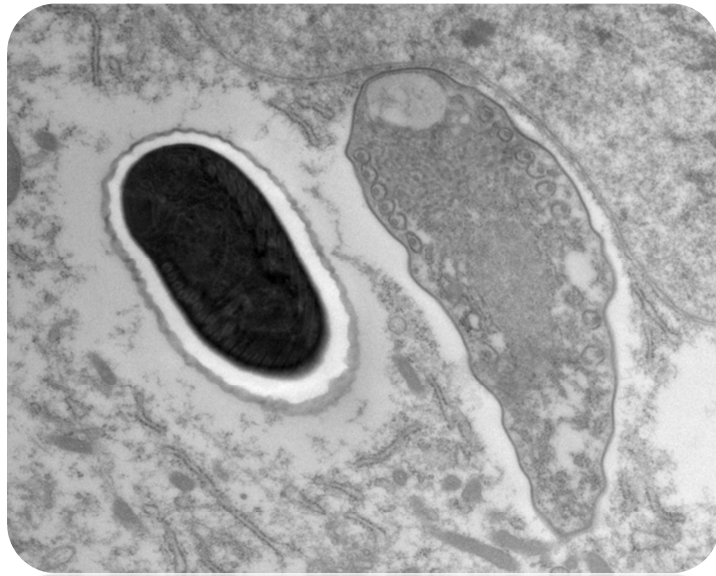
Tanto *V. destructor* como *N. apis* mostraron prevalencias relativamente bajas en ambos años de estudio, alrededor del 10% para ambos patógenos en 2010, sin embargo, se observó un aumento de varroa (15%) y un descenso de *N. apis* (8%) en 2011. En los apiarios estudiados *N. apis* presentó mayor prevalencia que varroa en 2010, pero en ningún caso fue detectado en las muestras de rutina. *Varroa destructor*

aumentó su prevalencia en el año 2011 en comparación con *N. apis* dentro de los casos con problemas patológicos.

Acarapis woodi fue el patógeno que presentó una menor prevalencia en 2010 y se mostró ausente en las muestras de 2011. También fue el menos detectado en las muestras recibidas por problemas patológicos o para análisis rutinario en 2010, lo que demuestra que los propietarios de las explotaciones apícolas no observan los signos clínicos de la acarapisosis. Realmente esta enfermedad no muestra claras evidencias de su presencia y las colonias de abejas deben presentar una alta carga parasitaria para ser detectada.

Al tratarse de un tamaño muestral reducido los valores de prevalencia obtenidos en la vigilancia pasiva son meramente descriptivos y no concluyentes, por ello estos resultados deben ser contrastados con los resultados de la vigilancia activa.

CONCLUSIONES



1. El agente patógeno más prevalente en este estudio ha sido *Nosema ceranae*, lo que le convierte en el mayor riesgo sanitario al que se enfrentan las colonias de abejas en España. La baja prevalencia de plaguicidas detectados y el bajo porcentaje de parasitación por *Varroa destructor* de las muestras analizadas, sugieren que estos agentes nosógenos no son los principales responsables de la mortalidad de colonias de abejas.

2. La alta prevalencia de tripanosomátidos detectada en esta tesis doctoral y su asociación con la mortalidad de colonias de abejas debe ser estudiada en profundidad, dado que hasta el momento se desconoce el número de especies que afectan a las abejas y su acción patógena real.

3. Los resultados de esta investigación sugieren que la clasificación taxonómica de algunos de los agentes patógenos ya conocidos de las abejas, como por ejemplo *Acarapis woodi*, debe ser abordada con mayor profundidad debido a que pueden existir variantes genéticas que no han sido tenidas en consideración hasta el momento.

4. Los virus de mayor prevalencia en la cabaña apícola española fueron realeras negras y alas deformadas, en el caso de este último y dada su asociación con *Varroa destructor* podrían suponer un riesgo sanitario para las colonias de abejas. Otros virus relacionados con la mortalidad de las colmenas, como el virus del lago Sinai y el complejo de los virus ABPV-KBV-IAPV, han presentado prevalencias muy bajas en esta memoria.

5. En lo referido a los plaguicidas, nuestro estudio demuestra que son los acaricidas los compuestos más frecuentemente detectados en polen, principalmente aquellos utilizados para el control de la varroosis. Por el contrario, la ausencia de neonicotinoides y fenilpirazoles indican el bajo riesgo que estas sustancias suponen en las condiciones apícolas de España.

6. La aplicación de sistemas de vigilancia activa, mediante muestreos sistemáticos, y vigilancia pasiva combinados con el desarrollo de técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad, resultan fundamentales para detectar las fluctuaciones en la prevalencia de los patógenos conocidos así como la detección precoz de agentes exóticos como *Aethina tumida*.

RESUMEN



MONITORIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES PATÓGENOS DE LAS ABEJAS PARA LA DETECCIÓN DE ALERTAS Y RIESGOS SANITARIOS

Las abejas, principalmente la especie *Apis mellifera*, desarrollan una función biológica muy importante puesto que se encargan de polinizar diversos cultivos agrícolas y la flora silvestre de todo el mundo. No obstante, existen numerosos factores que influyen en el estado sanitario de las colonias de abejas y presentan además un alto grado de interacciones entre ellos.

Algunos de los potenciales riesgos para la apicultura española ya han sido identificados, como por ejemplo las dos especies de microsporidios, *Nosema apis* y *N. ceranae*, que actúan como parásitos intracelulares obligados o los ectoparásitos *Varroa destructor*, *Acarapis woodi* o *Braula coeca*; así como numerosos virus capaces de infectar a *Apis mellifera*, de los cuales los principales son el virus de las alas deformadas (DWV), el virus de las realeras negras (BQCV), el virus Kashmir (KBV), el virus de la parálisis aguda (ABPV) y su variante israelí (IAPV). Otras enfermedades que afectan fundamentalmente a la cría de abejas son la loque americana y la loque europea, ambas de origen bacteriano (*Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* respectivamente), así como la ascosferosis causada por el hongo *Ascosphaera apis*. Otro riesgo potencial para las abejas es la posible entrada de agentes exóticos como el coleóptero *Aethina tumida* o el ácaro *Tropilaelaps clareae* cuya presencia en Europa debe ser declarada según la OIE (2015). Recientemente se ha incluido a los neogregarinos y tripanosomátidos como posibles agentes patógenos. Actualmente, *N. ceranae* junto con *V. destructor* son los principales agentes patógenos que producen problemas sanitarios de las colonias de abejas en Europa. Además, se considera que los patógenos podrían jugar un papel primordial en el incremento de mortalidad de las abejas detectado en distintos países durante los últimos años.

Por último, la contaminación del medioambiente que rodea a las abejas debida al uso de diversas sustancias agroquímicas, como los insecticidas, para el control de plagas en los cultivos puede también estar asociado a problemas sanitarios de las colonias de abejas. Los productos acaricidas, utilizados en el control de la varroosis, también son insecticidas y, por ello, su uso incorrecto y la aplicación de dosis superiores a las recomendadas tienen un efecto negativo en la población de abejas que se traducen en la aparición de resistencias a los acaricidas y la contaminación de la miel.

Los aspectos anteriormente expuestos indican la importancia de tener instaurado un sistema de vigilancia epidemiológica que permita el estudio de las enfermedades que afectan a las abejas para poder detectar nuevas patologías aún no identificadas en nuestro país, así como la variación en las prevalencias de aquellas enfermedades presentes de forma enzoótica y que causan un daño real a las abejas melíferas. Por tanto, en este estudio se ha desarrollado un sistema de monitorización para recolectar información de forma sistemática y continuada a cerca de las principales enfermedades apícolas por medio de dos tipos de vigilancia.

El sistema de vigilancia activa se compone de dos muestreos realizados a nivel nacional, basados en el censo de apicultores en cada comunidad autónoma. El sistema de muestreo requerido consistió en la selección aleatoria de seis muestras de cada colmenar y se programó realizar un muestreo anual en primavera, durante dos años consecutivos (2010 y 2011). Para llevar a cabo el muestreo se entregó un paquete con el material necesario a todos los organismos y asociaciones que mostraron interés en participar. Cada paquete correspondía al muestreo de un colmenar y contenía: 6 cajas para la recogida de abejas adultas, 6 cajas para la recogida de cría, 1 bote para la recogida de los restos del fondo de 6 colmenas, 1 bote para la recogida de polen de reservas de 1 colmena, 1 bote para recogida de miel de 1 colmena y una encuesta.

Los agentes analizados en abejas adultas fueron: *V. destructor*, *Nosema* spp., *A. woodi*, *Tropilaelaps* spp., *Braula* spp., tripanosomátidos, neogregarinos y virus (ABPV, KBV, IAPV, BQCV, DWV, LSV, SBV). En cría de abejas: *V. destructor*, *P. larvae*, *M. plutonius* y *A. apis*. Los restos del fondo de la colmena se destinaron para el análisis de *A. tumida*. Las muestras de polen y miel fueron enviadas a la Universidad de Valladolid para el análisis de plaguicidas y quimioterápicos.

Se recibió un total de 360 muestras del año 2010 y 275 en el año 2011. Aunque el número de muestras en algunos casos fue insuficiente para un posterior análisis por Comunidad Autónoma, sí permitió un análisis global a nivel nacional.

Para la vigilancia pasiva se utilizaron las muestras clínicas procedentes de colmenares dónde el apicultor había observado algún problema patológico. Se analizaron 132 muestras procedentes del año 2010 y 77 muestras en 2011.

De forma resumida, a lo largo de esta memoria se contemplaron los siguientes objetivos:

1. Establecer un sistema de vigilancia activa de agentes patógenos en abejas, cría y estructuras de las colmenas; además de evaluar la presencia de plaguicidas en polen y cera
2. Establecer un sistema de vigilancia con las muestras recibidas en el laboratorio de patología del CAR
3. Diseño y puesta a punto de nuevas técnicas rápidas de diagnóstico molecular
4. Análisis epidemiológico de los datos de vigilancia pasiva y activa para detectar cambios en la prevalencia y en el patrón estacional de las enfermedades, detectar la entrada de patógenos exóticos, vigilar los niveles de contaminación en polen y cera, y estudiar relaciones entre todos los factores determinados.

En cuanto a los resultados obtenidos en las muestras procedentes de la vigilancia activa, los agentes más prevalentes fueron *N. ceranae* y *V. destructor* tanto en 2010 como en 2011. Aunque *V. destructor* cuenta con un programa sanitario específico en nuestro país, que obliga a la realización de un tratamiento anual (subvencionado), nuestros resultados demuestran que ese control no está resultando adecuado. Por otro lado, *N. ceranae*, agente que fue recientemente identificado como parásito de las abejas melíferas, muestra unos niveles muy altos, indicando que existe un alto riesgo sanitario asociado a este patógeno. El resto de los agentes se mantienen en niveles similares a lo largo del tiempo, indicando su carácter endémico. Especial atención merece *A. woodi*, ya que el análisis genético de las secuencias obtenidas en este trabajo para el ácaro *A. woodi* indican la existencia de un nuevo grupo dentro de esta especie.

Las prevalencias calculadas para los neogregarinos y tripanosomátidos revelaron unos valores relativamente altos, sobre todo en el caso de los tripanosomátidos, y que son de gran importancia teniendo en cuenta que se desconoce el potencial patógeno de estos organismos en el estado sanitario de las abejas. Al realizar el análisis genético del tripanosomátido *Crithidia mellificae* y comparar las secuencias obtenidas en este estudio con la cepa de referencia de esta especie se observaron grandes distancias genéticas que indican la necesidad de revisar la clasificación taxonómica de este grupo.

Tras el procesado y posterior análisis de las muestras del fondo de colmena se pudo confirmar la ausencia del pequeño escarabajo de las colmenas en nuestro país.

En cuanto al análisis de virus, los más prevalentes en abejas adultas fueron BQCV y DWV.

En relación al estudio de plaguicidas en polen, solo un 21% de las muestras analizadas fueron positivas a algún compuesto. De los productos analizados, el fluvalinato y el clorpirifos etil fueron los más frecuentemente detectados y proceden del empleo de tratamientos varroocidas.

En el caso de la vigilancia pasiva los agentes más prevalentes asociados a casos de enfermedad fueron *N. ceranae*, los tripanosomátidos y *V. destructor* en muestras de abejas adultas. Resulta de especial importancia la vigilancia de estos tres agentes.

A lo largo de este estudio se han desarrollado las técnicas para la optimización del procesado previo de muestras y para la mejora en la determinación de *V. destructor* introduciendo un protocolo para la estimación del porcentaje de parasitación. Igualmente se ha desarrollado un método de procesado conjunto de las muestras para la extracción de los ácidos nucleicos (ADN) y optimizado la PCR de agentes que ya se habían desarrollado previamente (*N. apis* y *N. ceranae*) mediante la gelificación de los reactivos (incluyendo los cebadores) en placas (metodología registrada por *Biotoools*). Finalmente se desarrolló un nuevo método de PCR para la

detección de *A. woodi*, y se realizó la puesta a punto de una técnica de PCR para la detección de neogregarinos y tripanosomátidos en muestras de abejas adultas y de una PCR cuantitativa para la identificación de *A. tumida* en muestras del fondo de la colmena utilizando sondas TaqMan.

Las conclusiones extraídas de este estudio se muestran a continuación:

1. El agente patógeno más prevalente en este estudio ha sido *Nosema ceranae*, lo que le convierte en el mayor riesgo sanitario al que se enfrentan las colonias de abejas en España. La baja prevalencia de plaguicidas detectados y el bajo porcentaje de parasitación por *Varroa destructor* de las muestras analizadas, sugieren que estos agentes nosógenos no son los principales responsables de la mortalidad de colonias de abejas.

2. La alta prevalencia de tripanosomátidos detectada en esta tesis doctoral y su asociación con la mortalidad de colonias de abejas debe ser estudiada en profundidad, dado que hasta el momento se desconoce el número de especies que afectan a las abejas y su acción patógena real.

3. Los resultados de esta investigación sugieren que la clasificación taxonómica de algunos de los agentes patógenos ya conocidos de las abejas, como por ejemplo *Acarapis woodi*, debe ser abordada con mayor profundidad debido a que pueden existir variantes genéticas que no han sido tenidas en consideración hasta el momento.

4. Los virus de mayor prevalencia en la cabaña apícola española fueron realeras negras y alas deformadas, en el caso de este último y dada su asociación con *Varroa destructor* podrían suponer un riesgo sanitario para las colonias de abejas. Otros virus relacionados con la mortalidad de las colmenas, como el virus del lago Sinai y el complejo de los virus ABPV-KBV-IAPV, han presentado prevalencias muy bajas en esta memoria.

5. En lo referido a los plaguicidas, nuestro estudio demuestra que son los acaricidas los compuestos más frecuentemente detectados en polen, principalmente aquellos utilizados para el control de la varroosis. Por el contrario, la ausencia de neonicotinoides y fenilpirazoles indican el bajo riesgo que estas sustancias suponen en las condiciones apícolas de España.

6. La aplicación de sistemas de vigilancia activa, mediante muestreos sistemáticos, y vigilancia pasiva combinados con el desarrollo de técnicas moleculares de alta sensibilidad y especificidad, resultan fundamentales para detectar las fluctuaciones en la prevalencia de los patógenos conocidos así como la detección precoz de agentes exóticos como *Aethina tumida*.

SUMMARY



MONITORING THE MAIN HONEYBEE PATHOGENS IN ORDER TO DETECT AND ESTABLISH HEALTH HAZARD ALERTS

The bees, and the species *Apis mellifera* among them, provide an essential ecosystem service by pollinating many crops and wild flora worldwide. However, there are numerous factors that can influence the health of bee colonies, either acting in isolation or in combination, as some of them can present a high degree of interaction.

Some of the potential risks for the Spanish beekeeping have already been identified, such as two species of microsporidia, *Nosema apis* and *N. ceranae*, which act as obligate intracellular parasites. Moreover, the ectoparasites *Varroa destructor*, *Acarapis woodi* or *Braula coeca*, as well as numerous viruses that can infect *Apis mellifera*, namely deformed wing virus (DWV), black queen cells virus (BQCV), Kashmir bee virus (KBV), acute bee paralysis virus (ABPV) and his Israeli variant (IAPV), also represent a potential threat. Other diseases primarily affecting beekeeping are American foulbrood and European foulbrood, both of bacterial origin (*Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* respectively) as well as ascosferosis caused by fungus *Ascosphaera apis*. Another potential risk to bees is the possible entry of exotic agents as the *Aethina tumida* beetle and *Tropilaelaps clareae* mite, whose presence in Europe should be declared (OIE, 2015). Neogregarines and trypanosomatids have been recently included as potential pathogens for the honeybee. Currently, *N. ceranae* and *V. destructor* are major pathogens causing health problems in honeybee colonies in Europe. In addition, it is considered that pathogens could play a major role in the increased mortality of honeybees detected in different countries in recent years.

Finally, the environmental pollution surrounding the bees due to the use of various agrochemicals such as insecticides used in crops for pest control can also be associated with health problems in bee colonies. Acaricides used to control varroosis have also insecticidal activity and, therefore, improper use and application of higher doses than recommended have a negative effect on the honeybee population, resulting in the emergence of resistance to these compounds and contamination of honey.

The above mentioned aspects indicate the importance of having a surveillance system for the study of honeybee diseases in order to detect new diseases not yet identified in our country, as well as variations in the prevalence of these detrimental enzootic diseases. Therefore, in this thesis, a monitoring system has been developed to systematically and continuously collect information about the major honeybee diseases by the use of two different types of surveillance.

The active surveillance system consisted on two samplings at the national level, based on the census of beekeepers in each region. The sampling consisted on the random selection of six samples from each apiary and aimed to make an annual

sampling in spring for two consecutive years (2010 and 2011). To carry out the sampling, a package with the necessary equipment was delivered to all the participating associations. Every package for the sampling of an apiary contained: 6 boxes to collect adult bees, 6 boxes to collect brood, 1 jar to collect the hive waste from the bottom board of 6 hives, 1 jar to collect stored pollen of 1 beehive, 1 bottle to collect honey of 1 hive and one survey to be filled by the beekeeper.

The agents analyzed in adult bees were: *V. destructor*, *Nosema* spp, *A. woodi*, *Tropilaelaps* spp, *Braula* spp, trypanosomatids, neogregarines and viruses (ABPV, KBV, IAPV, BQCV, DWV, LSV, SBV). In the brood: *V. destructor*, *P. larvae*, *M. plutonius* and *A. apis*. The debris collected from the bottom of the hive was used to detect *A. tumida*. The pollen and honey samples were sent to the University of Valladolid for the analysis of pesticides and chemotherapeutic compounds.

A total of 360 samples were received in 2010 and 275 in 2011. Although the number of samples was insufficient for later analysis by Autonomous Community in some cases, it did allow an overall analysis at the national level.

Passive surveillance was based on the analysis of clinical samples collected from apiaries where the beekeepers had observed some pathological problems. In this case, 132 samples were analyzed in 2010, and 77 samples in 2011.

In summary, this study addressed the following objectives:

1. Establishment of an active surveillance system for honeybee pathogens in adult bees, in the brood, and in different hive matrices; in addition, pesticides in pollen and wax were analyzed
2. Establishment of a monitoring system with the samples received in the Laboratory of Bee Pathology (CAR)
3. Design and development of new rapid molecular diagnostic techniques
4. Epidemiological analysis of passive and active surveillance to detect changes in the prevalence and the seasonal pattern of honeybee diseases, in order to detect the possible entry of exotic pathogens, to monitor pollution levels in pollen and wax, and to study relationships between all the nosogenic factors detected.

As for the results obtained from the samples of the active surveillance, the most prevalent agents were *N. ceranae* and *V. destructor* both in 2010 and 2011. Although *V. destructor* has a specific health program in our country, where beekeepers have to apply an annual treatment (subsidized), our results show that this control is not effective. On the other hand, *N. ceranae*, an agent that was recently identified as a parasite of the European honeybee, shows very high levels, indicating that there is a high health risk associated with this pathogen. The other agents remain at similar

levels over time, indicating their endemic character. *Acarapis woodi* deserves special attention because the genetic analysis of the sequences obtained in this work for *A. woodi* mite indicate the existence of a new group within the species.

The prevalence calculated for the neogregarines and trypanosomatids revealed high values, especially in the case of trypanosomatids, which are of great importance because their pathogenic potential in the honeybee health is unknown. When the genetic analysis of the trypanosomatid *Crithidia mellificae* was performed, and the sequences obtained in this study were compared with the reference strain of this species, large genetic distances were observed, indicating the need to revise the taxonomy of this group.

The analysis of debris samples collected from the bottom of the hive confirmed the absence of the small hive beetle in our country.

Regarding the analysis of virus, BQCV and DWV were the most prevalent in adult bees.

Regarding the study of pesticides in pollen, only 21% of samples tested were positive to some compounds. From the products tested, the varroa treatments fluvalinate and ethyl chlorpyrifos were the most frequently detected.

As for the passive monitoring, the most prevalent pathogens associated with disease in honeybee colonies were *N. ceranae*, trypanosomatids and *Varroa destructor*, detected in samples of adult bees. This reveals the high importance of establishing a monitoring program for these three agents.

Throughout this study we have developed techniques to optimize the pre-processing of samples and to improve the determination of *Varroa destructor* by the design of a protocol to estimate the percentage of parasitism. Moreover, sample processing was improved in order to allow joint extraction of nucleic acids (DNA), and the previously designed PCR used to detect *N. ceranae* and *N. apis* was optimized by gelling reagents (including primers) in a plate (registered methodology *Biotoools*). Additionally, we developed a new PCR method for the detection of *A. woodi*, and the PCR technique designed to detect neogregarines and trypanosomatids in samples of adult bees was improved. Finally, the quantitative PCR method to identify *A. tumida* in samples from debris of the bottom of the hive using TaqMan probes was also optimized.

The conclusions from this study are:

1. The most prevalent pathogen in this study was *Nosema ceranae*, being the biggest health risk for honeybee colonies in Spain. The low prevalence of pesticides detected and the low percentage of parasitism by *Varroa destructor* of in the samples

suggest that these nosogenic agents are not primarily responsible for the death of honeybee colonies.

2. The high prevalence of trypanosomatids detected in this study and its association with mortality of bee colonies should be further studied, since both the number of species affecting honeybees and their actual pathogenic action are unknown.

3. The results of this research suggest that the taxonomic classification of some of the known honeybee pathogens, such as *Acarapis woodi*, should be studied in greater depth because there may be genetic variants that have not been taken into consideration until now.

4. The most prevalent viruses in the Spanish beehives were black queen cells virus and deformed wings virus, the latter one posing a greater health risk to honeybee colonies due to its association with *Varroa destructor*. Another viruses related with mortality of hives in other studies, as the complex of ABPV-KBV-IAPV and Lake Sinai virus, showed very low prevalences in our study.

5. With regard to pesticides, our study shows that miticides are the most frequently detected compounds in pollen, mainly those used to control varroosis. Conversely, the absence of neonicotinoids and phenylpyrazoles suggest that these compounds represent a low risk for the honeybee colonies in the Spanish conditions.

6. The application of the active surveillance by systematic sampling, and the passive surveillance combined with the development of molecular techniques of high sensitivity and specificity, are essential tools to detect fluctuations in the prevalence of known pathogens, as well as for the early detection of exotic agents such as *A. tumida*.

BIBLIOGRAFÍA



- Adam B. "Isle of Wight" or acarine disease: Its historical and practical aspects. *Bee World*. 1968;49(1):6–18.
- Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, y col. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol*. 2005;52(5):399–451.
- Ahn A-J, Ahn K-S, Noh J-H, Kim Y-H, Yoo M-S, Kang S-W, y col. Molecular prevalence of *Acarapis* mite infestations in honey bees in Korea. *Korean J Parasitol*. 2015; 53(3):315–20.
- Alattal Y, Alsharhi M, Al Ghamdi A, Alfaify S, Migdadi H, Ansari M. Characterization of the native honey bee subspecies in Saudi Arabia using the mtDNA COI–COII intergenic region and morphometric characteristics. *Bull Insectol*; 2014;67(1):31–37.
- Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, y col. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol*. 2010;12(3):774–82.
- Alaux C, Crauser D, Pioz M, Saulnier C, Le Conte Y. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *J Exp Biol*. 2014;217(19):3416–24.
- Albo GN, Cerimele E, Re MS, De Giusti M, Alippi A. Ensayos de campo para evaluar la efectividad de algunos aceites esenciales. *Vida Apícola*. 2001;108:41–6.
- Albo GN, Henning C, Ringuelet J, Reynaldi FJ, Giusti MR, Alippi AM. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*. 2003;34(5):417–427.
- Alburaki M, Boutin S, Mercier P-L, Loublier Y, Chagnon M, Derome N. Neonicotinoid-coated *Zea mays* seeds indirectly affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125790.
- Al-Chzawi AA-MA, Zaitoun ST, Shannag HK. Incidence and geographical distribution of honeybee (*Apis mellifera* L.) pests in Jordan. *Annales-Société entomologique de France*. 2009;45(3):305–8.
- Aliferis KA, Copley T, Jabaji S. Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J Insect Physiol*. 2012;58(10):1349–59.
- Alippi AM. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* L., in Argentina. *J Apic Res*. 1991;30(2):75–80.
- Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American

- foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 1992;24(2):67–72.
- Alippi AM. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia SEM.* 1995;11(3):343–50.
- Alippi AM, Ringuelet JA, Cerimele EL, Re MS, Henning CP. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. *J Herbs Spices Med Plants.* 1996;4(2):9–16.
- Alippi AM, López AC, Aguilar OM. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(7):3655–60.
- Alippi AM, López AC, Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol.* 2004;39(1):25–33.
- Alippi AM, López AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar OM. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet Microbiol.* 2007;125(3-4):290–303.
- Alippi AM, León IE, López AC. Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. *Int Microbiol.* 2014;17(1):49–61.
- Allen MF, Ball BV. The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J Apic Res.* 1993;32(2):80–8.
- Allen MF, Ball BV. Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Ann Appl Biol.* 1995;126(3):471–84.
- Allen MF, Ball BV. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World.* 1996;77(3):141–62.
- Allen MF, Ball BV, Underwood BA. An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *J Invertebr Pathol.* 1990;55(3):439–40.
- Amdam GV, Omholt SW. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *J Theor Biol.* 2002;216(2):209–28.
- Anderson DL. Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie.* 2000;31(2):281–92.
- Anderson DL, Gibbs AJ. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *J Gen Virol.* 1988;69(7):1617–25.

- Anderson DL, Giacon H. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. J Econ Entomol. 1992;85(1):47–51.
- Anderson DL, Fuchs S. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. J Apic Res. 1998;37(2):69–78.
- Anderson DL, Gibson NL. New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. Aust Syst Bot. 1998;11(1):53–72.
- Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp Appl Acarol. 2000;24(3):165–89.
- Anderson DL, Morgan MJ. Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. Exp Appl Acarol. 2007;43(1):1–24.
- Anderson DL, East IJ. The latest buzz about colony collapse disorder. Science. 2008;319(5864):724–725.
- Annand N. Investigations on small hive beetle biology to develop better control options. Sydney: Centre for plants and the environment, University of Western Sydney; 2011.
- ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. France: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety; 2015 [citado 14 Oct 2015]. Disponible en: <https://www.anses.fr/fr>
- Antúñez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honey bee viruses in Uruguay. J Invertebr Pathol. 2006;91(1):67–70.
- Antúñez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. Vet Microbiol. 2007;124(1-2):178–83.
- Antúñez K, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. Vet Microbiol. 2008;131(3-4):324–31.
- Antúñez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). Environ Microbiol. 2009;11(9):2284–90.
- Antúñez K, Anido M, Evans JD, Zunino P. Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. Vet Microbiol. 2010;141(3–4):385–9.

- Antúñez K, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campá J, Zunino P. American foulbrood in Uruguay: twelve years from its first report. *J Invertebr Pathol*. 2012a;110(1):129–31.
- Antúñez K, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, y col. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci*. 2012b;93(3):1441–5.
- Antúñez K, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campa J, Invernizzi C, y col. Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microb Ecol*. 2015;7(2):522–33.
- Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, y col. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One*. 2012;7(3):e33708.
- Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, y col. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *J Vet Med Sci*. 2014;76(4):491–8.
- Arbogast RT, Torto B, VanEngelsdorp D, Teal PE. An effective trap and bait combination for monitoring the small hive beetle, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Fla Entomol*. 2007;90(2):404–6.
- Arbogast RT, Torto B, Willms S, Fombong AT, Duehl A, Teal PE. Estimating reproductive success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in honey bee colonies by trapping emigrating larvae. *Environ Entomol*. 2012;41(1):152–8.
- Arias MC, Sheppard WS. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Phylogenet Evol*. 2005;37(1):25–35.
- Aronstein KA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S20–9.
- Aronstein KA, Murray KD, De Leon JH, Qin X, Weinstock GM. High mobility group (HMG-box) genes in the honeybee fungal pathogen *Ascosphaera apis*. *Mycologia*. 2007;99(4):553–61.
- Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993;64(3-4):253–60.
- Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One*. 2014;9(3):e91686.

- Awise JC. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge (Massachusetts): Harvard University Press; 2000.
- Baer B, Schmid-Hempel P. Unexpected consequences of polyandry for parasitism and fitness in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Evolution*. 2001;55(8):1639–43.
- Bailey L. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Ann Appl Biol*. 1955;43(3):379–89.
- Bailey L. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *J Gen Microbiol*. 1957;17(1):39–48.
- Bailey L. Infectious diseases of the honeybee. London: Land Books Ltd; 1963.
- Bailey L. The “Isle of Wight Disease”: the origin and significance of the myth. *Bee World*. 1964;45(1):32–7.
- Bailey L. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee, *Apis mellifera*. En: Vand der Laan PA, editor. *Insect pathology and microbial control*. Amsterdam: North Holland Publishing Co; 1967a. p. 162–7.
- Bailey L. Acute bee-paralysis virus in adult honey bees injected with sacbrood virus. *Virology*. 1967b;33(2):368.
- Bailey L. Honey bee pathology. 1st ed. London (UK): Academic Press; 1981.
- Bailey L. *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *J Appl Microbiol*. 1983;55(1):65–9.
- Bailey L, Gibbs AJ. Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated *Enterococci*. *J Gen Microbiol*. 1962;28:385–91.
- Bailey L, Gibbs AJ. Acute infection of bees with paralysis virus. *J Insect Pathol*. 1964;6(4):395–407.
- Bailey L, Collins MD. Reclassification of “*Streptococcus pluton*” (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *J Appl Microbiol*. 1982;53(2):215–7.
- Bailey L, Ball BV. Honey bee pathology. 2nd ed. London (UK): Academic Press; 1991.
- Bailey L, Perry JN. The natural control of the tracheal mite of honey bees. *Exp Appl Acarol*. 2001;25(9):745–9.
- Bailey L, Carpenter JM, Woods RD. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J Gen Virol*. 1979;43(3):641–7.

- Bailey L, Ball BV, Perry JN. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann Appl Biol.* 1981;97(1):109–18.
- Baker A, Schroeder D. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J Invertebr Pathol.* 2008;98(2):239–42.
- Bakhiet N, Sthaly DP. Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. *Appl Environ Microbiol.* 1985;50(3):690–2.
- Balança G, De Visscher N. Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. *Crop Prot.* 1997;16(6):553–64.
- Ball BV. *Varroa jacobsoni* as a virus vector. En: Cavalloro R, editor. Present status of varroaosis in Europe and progress in the *Varroa* mite control. Proceedings of a meeting of the EC expert's group; 1988 Nov 28–30; Udine, Italy. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 1989. p. 241–4.
- Ball BV, Allen MF. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Appl Biol.* 1988;113(2):237–44.
- Bamford S, Heath LAF. The effect of temperature and pH on the germination of spores of the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *J Apic Res.* 1989;28:36–40.
- Bassi S, Formato G, Milito M, Trevisiol K, Salogni C, Carra E. Phenotypic characterization and ERIC-PCR based genotyping of *Paenibacillus larvae* isolates recovered from American foulbrood outbreaks in honey bees from Italy. *Vet Q.* 2015;35(1):27–32.
- Bastos EM, Simone M, Jorge DM, Soares AE, Spivak M. *In vitro* study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* 2008;97(3):273–81.
- Basualdo M, Barragan S, Antúnez K. Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environ Microbiol Rep.* 2014;6(4):396–400.
- Becher MA, Grimm V, Thorbek P, Horn J, Kennedy PJ, Osborne JL. BEEHAVE: a systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. *J Appl Ecol.* 2014;51(2):470–82.
- Bekele AZ, Mor SK, Phelps NBD, Goyal SM, Armien AG. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Vet Q.* 2015;35(1):48–50.
- Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, y col. Spatial distribution of

- Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie*. 2007;38(2):136–40.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*. 2012;43(3):348–70.
- Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2001(5);67:2384–7.
- Berenyi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglbberger H, Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased austrian apiaries. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):2414–20.
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, y col. Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J Econ Entomol*. 2010;103(6):1964–71.
- Bernal J, Martín-Hernández R, Diego JC, Nozal MJ, González-Porto AV, Bernal JL, y col. An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Manag Sci*. 2011;67(10):1320–31.
- Berry JA, Hood WM, Pietravalle S, Delaplane KS. Field-level sublethal effects of approved bee hive chemicals on honey bees (*Apis mellifera* L). *PLoS One*. 2013;8(10):e76536.
- Betti MI, Wahl LM, Zamir M. Effects of infection on honey bee population dynamics: a model. *PLoS One*. 2014;9(10):e110237.
- Bisset J. Contribution toward a monograph of the genus *Ascosphaera*. *Can J Bot*. 1988;66(12):2541–60.
- Boecking O, Genersch E. Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. *J Verbr Lebensm*. 2008;3(2):221–8.
- Bogdanov S, Kilchenmann V, Imdorf A. Acaricide residues in some bee products. *J Apic Res*. 1998;37(2):57–67.
- Boonsai P, Phuwapraisirisan P, Chanchao C. Antibacterial activity of a cardanol from thai *Apis mellifera* propolis. *Int J Med Sci*. 2014;11(4):327–36.
- Borum AE, Ulgen M. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in north-west Turkey. *J Apic Res*. 2008;47(2):170–1.
- Bos C, Masson C. Analyse des effets, en particulier de la répulsivité, d'un pyéthrinoïde de synthèse, la deltaméthrine, sur les abelles. *Agronomie*. 1983;3(6):545–53.

- Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Martínez-Salvador A, De La Rúa P, y col. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res Vet Sci*. 2012a;93(1):150–5.
- Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz Á, y col. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies: queen replacement influences *Nosema* infection in honey bee colonies. *Environ Microbiol*. 2012b;14(4):845–59.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet Res*. 2013;44(1):25.
- Bourgeois AL, Rinderer TE, Sylvester HA, Holloway B, Oldroyd BP. Patterns of *Apis mellifera* infestation by *Nosema ceranae* support the parasite hypothesis for the evolution of extreme polyandry in eusocial insects. *Apidologie*. 2012;43(5):539–48.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. Preferential distribution of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud. on overwintering honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and changes in the level of parasitism. *Parasitology*. 1997;114(2):151–7.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honey bees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J Invertebr Pathol*. 1999;73(1):101–6.
- Bradbear N. Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2009.
- Brodschneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J Apic Res*. 2010;49(1):23–30.
- Brødsgaard CJ, Hansen H, Ritter W. Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared single in vitro, in micro colonies, or in full-size colonies. *J Apic Res*. 2000;39(1-2):19–27.
- Brown MJF, Loosli R, Schmid-Hempel P. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos*. 2000;91(3):421–7.
- Brown MJF, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *J Anim Ecol*. 2003;72(6):994–1002.
- Budge, G. *Nosema ceranae*. What is *Nosema ceranae* and how do you test for it?. *Bee Cr*. 2008;1:7–8.

- Budge GE, Barrett B, Jones B, Pietravalle S, Marris G, Chantawannakul P, y col. The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J Invertebr Pathol.* 2010; 105(2):164–70.
- Budge GE, Shirley MDF, Jones B, Quill E, Tomkies V, Feil EJ, y col. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *ISME J.* 2014;8(8):1588–97.
- Budge GE, Pietravalle S, Brown M, Laurenson L, Jones B, Tomkies V, y col. Pathogens as predictors of honey bee colony strength in England and Wales. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133228.
- Cai J, Collins MD. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1994;44(2):365–7.
- Campano F, Flores JM, Puerta F, Ruíz JA, Ruz JM. Fungal diseases of the honeybee (*Apis mellifera* L.). En: Colin ME, Ball BV, Kilani M, editors. Zaragoza: CIHEAM, Options Méditerranéennes, Série B, Etudes et Recherches nº 25; 1999. p. 61-68
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia (NW España). *Archivos de Zootecnia.* 2002;51(196):441–8.
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Geographic patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J Zoolog Syst Evol Res.* 2008;46(1):24–30.
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie.* 2011;42(3):235–51.
- Carpana E, Marocchi L, Gelmini L. Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie.* 1995;26(1):11–6.
- Carreck NL, Ratnieks FLW. The dose makes the poison: have “field realistic” rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? *J Apic Res.* 2014;53(5):607–14.
- Cepero A, Ravoet J, Gómez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bartolomé C, y col. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res Notes.* 2014a;7:649. (Anexo III)
- Cepero A, Higes M, Martínez-Salvador A, Meana A, Martín-Hernández R. A two year national surveillance for *Aethina tumida* reflects its absence in Spain. *BMC Res*

Notes. 2014b;7:878. (Anexo IV)

Cepero A, Martín-Hernández R, Prieto L, Gómez-Moracho T, Martínez-Salvador A, Bartolomé C, y col. Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its prevalence. *Parasitol Res.* 2015a;114(2):651–8. (Anexo V)

Cepero A, Martín-Hernández R, Bartolomé C, Gómez-Moracho T, Barrios L, Bernal J y col. Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse”. *J Apic Res.* 2015b;(Aceptado 10/03/2015). (Anexo VI)

Chagas SS, Almeida-Vaucher R, Brandelli A. Detection of *Paenibacillus larvae* by real-time PCR. *Acta Sci Vet.* 2010;38(3):251–6.

Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol.* 2006;91(1):69–73.

Chauzat M-P, Faucon J-P. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Manag Sci.* 2007;63(11):1100–6.

Chauzat M-P, Faucon J-P, Martel A-C, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol.* 2006;99(2):253–62.

Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C, Bougeard S, Cougoule N, Porta P, y col. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ Entomol.* 2009;38(3):514–23.

Chauzat M-P, Carpentier P, Madec F, Bougeard S, Cougoule N, Drajnudel P, y col. The role of infectious agents and parasites in the health of honey bee colonies in France. *J Apic Res.* 2010;49(1):31–9.

Chauzat MP, Martel AC, Cougoule N, Porta P, Lachaize J, Zeggane S, y col. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ Toxicol Chem.* 2011;30(1):103–11.

Chauzat M-P, Cauquil L, Roy L, Franco S, Hendrikx P, Ribière-Chabert M. Demographics of the European apicultural industry. *PLoS One.* 2013;8(11):e79018.

Chen YP, Siede R. Honey bee viruses. *Adv Virus Res.* 2007;70:33–80.

Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie.* 2004;35(4):441–8.

Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl*

- Environ Microbiol. 2005a;71(1):436–41.
- Chen YP, Pettis JS, Feldlaufer MF. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. J Invertebr Pathol. 2005b;90(2):118–21.
- Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF. Prevalence and transmission of honeybee viruses. Appl Environ Microbiol. 2006;72(1):606–11.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. J Invertebr Pathol. 2008;97(2):186–8.
- Cobb M. Reading and writing the book of nature: Jan Swammerdam (1637-1680). Endeavour. 2000;24(3):122–8.
- Cobb M. Jan Swammerdam on social insects: a view from the seventeenth Century. Insectes Sociaux. 2002;49(1):92–7.
- Cole LM, Nicholson RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. Pestic Biochem Physiol. 1993;46(1):47–54.
- Colin ME, Vandame R, Jourdan P, Di Pasquale S. Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. Apidologie. 1997;28(6):375–84.
- Colin ME, Le Conte Y, Vermandere JP. Managing nuclei in insect-proof tunnel as an observation tool for foraging bees: sublethal effects of deltamethrin and imidacloprid. En: Belzunces LP, Pelissier C, Lewis GB, editors. Hazards of pesticides to bees. Paris: INRA; 2001. p. 259–268.
- COLOSS workshop conclusions. [Internet]. Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803); 2009 Oct 19-22; Guadalajara (Spain). 2009. [citado 18 Oct 2015]. Disponible en: <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online>
- Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, López D, Pettis JS, y col. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. PLoS One. 2012;7(8): e43562.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. Science. 2007;318(5848):283–7.
- Cuthbertson AGS, Mathers JJ, Blackburn LF, Brown MA, Marris G. Small hive beetle: the next threat to British honey bees? Biologist. 2010;57(1):35–9.
- Cuthbertson AGS, Mathers JJ, Blackburn LF, Powell ME, Marris G, Pietravalle S, y col.

Screening commercially available entomopathogenic biocontrol agents for the control of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) in the UK. *Insects*. 2012;3(3):719–26.

Dadant C, Dadant CP. The hive and the honey bee. 4th ed. Illinois (USA): Journal Printing Co.; 1975.

Dahle B. The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *J Apic Res*. 2010;49(1):124–5.

Dainat B, Neumann P. Clinical signs of deformed wing virus infection are predictive markers for honey bee colony losses. *J Invertebr Pathol*. 2013;112(3):278–80.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One*. 2012;7(2):e32151.

Danka RG, Villa JD. An association in honey bees between autogrooming and the presence of migrating tracheal mites. *Apidologie*. 2005;36(3):331–3.

Daughenbaugh KF, Martin M, Brutscher LM, Cavigli I, Garcia E, Lavin M, y col. Honey bee infecting Lake Sinai viruses. *Viruses*. 2015;7(6):3285–309.

Dauterman WC, O'Brien RD. Cholinesterase variation as a factor in organophosphate selectivity in insects. *J Agric Food Chem*. 1964;12(4):318–9.

Dawicke BL, Otis GW, Scott-Dupree C, Nars M. Host preference of the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie). *Exp Appl Acarol*. 1992;15(2):83–98.

Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue MH. Learning performances of honeybee (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci*. 2003;59(3):269–78.

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2004;57(3):410–9.

De Graaf DC, De Vos P, Heyndrickx M, Van Trappen S, Peiren N, Jacobs FJ. Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis. *J Invertebr Pathol*. 2006;91(2):115–23.

De Graaf DC, Alippi AM, Antúnez K, Aronstein KA, Budge G, De Koker D, y col. Standard methods for American foulbrood research. *J Apic Res*. 2013;52(1).

De Guzman LI, Rinderer TE, Beaman LD. Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L. *Exp Appl Acarol*. 1993;17(4):283–90.

- De Guzman LI, Delfinado-Baker M. A new species of *Varroa* (Acari: Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *Int J Acarology*. 1996;22(1):23–7.
- De Guzman LI, Rinderer TE. Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*. 1999;30(2-3):85–95.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Delatte GT, Stelzer JA, Beaman L, Kuznetsov V. Resistance to *Acarapis woodi* by honey bees from far-eastern Russia. *Apidologie*. 2002;33(4):411–5.
- De Guzman LI, Rinderer TE, Bigalk M, Tubbs H, Bernard SJ. Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) infestations and overwintering survival. *J Econ Entomol*. 2005;98(6):1796–801.
- De Guzman LI, Frake AM, Rinderer TE, Arbogast RT. Effect of height and color on the efficiency of pole traps for *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *J Econ Entomol*. 2011;104(1):26–31.
- De Jong D. Experimental enhancement of chalkbrood infection. *Bee World*. 1976;57(3):114–5.
- De Jong D, Morse A, Eickwort GC. Mite pests of honey bee. *Annu Rev Entomol*. 1982;27:229–52.
- Delaplane KS, Mayer DF. Crop pollination by bees. Wallingford (UK) and New York (USA): CABI Publishing; 2000.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J. Mitochondrial variability of honeybee populations from the Canary Islands. *Mol Ecol*. 1998;7(11):1543–7.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands. *Apidologie*. 2001a;32(5):417–27.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Mol Ecol*. 2001b;10(7):1733–42.
- De la Rúa P, Hernández-García R, Pedersen BV, Galián J, Serrano J. Diversidad molecular de la abeja *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) de Andalucía Occidental. *Arch Zootec*. 2004a;53:195–203.
- De la Rúa P, Jiménez Y, Galián J, Serrano J. Evaluation of the diversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from Eastern Spain. *J Apic Res*. 2004b;43(4):162–6.
- De la Rúa P, Hernández-García R, Jiménez Y, Galián J, Serrano J. Biodiversity of *Apis*

mellifera iberica (Hymenoptera: Apidae) from north-eastern Spain assessed by mitochondrial análisis. *Insect Syst Evol.* 2005;36:21–8.

De la Rúa P, Jaffé R, Dall’Olio R, Muñoz I, Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie.* 2009;40(3):263–84.

Delfinado-Baker MD, Baker EW. Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). *J Wash Acad Sci.* 1974;64:4–10.

Delfinado-Baker MD, Baker EW. A new species of *Tropilaelaps* parasitic on honey bees. *Am Bee J.* 1982a;122:416–417.

Delfinado-Baker M, Baker EW. Notes on honey bee mites of the genus *Acarapis* Hirst (Acari: Tarsonemidae). *Int J Acarology.* 1982b;8(4):211–26.

Delfinado-Baker M, Aggarwal K. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *Int J Acarology.* 1987;13(4):333–7.

De Miranda JR, Genersch E. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(1):S48–61.

De Miranda JR, Cordoni G, Budge G. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(1):S30–47.

De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge GE, Chejanovsky N, y col. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J Apic Res.* 2013;52(4):1–56.

De Smet L, Ravoet J, De Miranda JR, Wenseleers T, Mueller MY, Moritz RFA, y col. BeeDoctor, a versatile MLPA-based diagnostic tool for screening bee viruses. *PLoS One.* 2012;7(10):e47953.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech J-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:81–106.

Didier ES. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP- 470 on microsporidial replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(7):1541–6.

Dietemann V, Pflugfelder J, Anderson D, Charrière J-D, Chejanovsky N, Dainat B, y col. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *J Apic Res.* 2012;51(1):125–32.

Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, y col. Standard methods for varroa research. *J Apic Res.* 2013;52(1).

Dingmann DW, Stahly DP. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl Environ Microbiol.* 1983;46(4):860–9.

Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y. *Varroa destructor* is

an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. J Gen Virol. 2011;92(1):151–5.

Directiva 90/425/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, relativa a los controles veterinarios y zootécnicos aplicables en los intercambios intracomunitarios de determinados animales vivos y productos con vistas a la realización del mercado interior. Diario Oficial de la Unión Europea L 224, de 18 de agosto de 1990.

Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Diario Oficial de la Unión Europea L 230 de 19 de agosto de 1991.

Directiva 2007/52/CE de la Comisión de 16 de Agosto de 2007 por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo a fin de incluir en ella las sustancias activas, etoprofos, pirimifos-metilo y fipronil. Diario Oficial de la Unión Europea L 214/3 de 17 de agosto de 2007.

Djordjevic S, Ho-Shon M, Hornitzky MAZ. DNA restriction endonuclease profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*. J Apic Res. 1994;33(2):95–103.

Djordjevic SP, Noone K, Smith L, Hornitzky MAZ. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. J Apic Res. 1998;37:165–74.

Djukic M, Brzuszkiewicz E, Fünfhaus A, Voss J, Gollnow K, Poppinga L, y col. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. PLoS One. 2014;9(3): e90914.

Dobbelaere W, De Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. J Apic Res. 2001a;40(1):37–40.

Dobbelaere W, De Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. Apidologie. 2001b;32(4):363–70.

Donzé G, Guerin PM. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. Behav Ecol Sociobiol. 1994;34(5):305–19.

Donzé G, Herrmann M, Bachofen B, Guerin PM. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. Ecol Entomol. 1996;21(1):17–26.

Donzé G, Schneyder-Candrian S, Bogdanov S, Diehl PA, Guerin PM, Kilchenmann V, y col. Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behaviour in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*. Arch Insect Biochem Physiol. 1998;37(2):129–45.

- Doublet V, Natsopoulou ME, Zschiesche L, Paxton RJ. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J Invertebr Pathol*. 2015;124:31–4.
- Doull KM. The effects of time of day and method of sampling on the determination of nosema disease in beehives. *J Invertebr Pathol*. 1965;7(1):1–4.
- Downey DL, Winston ML. Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie*. 2001;32(6):567–75.
- Duay P, De Jong D, Engels W. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet Mol Res*. 2002;1(3):227–32.
- Durrer S, Schmid-Hempel P. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proc R Soc Lond B*. 1994;258(1353):299–302.
- Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M, Colbourne JK, López J, Choi J-H, y col. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*. 2012;7(5):e37017.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D, Beslay D, Costagliola G, Soubeyrand S, y col. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J Invertebr Pathol*. 2013a;113(1):42–51.
- Dussaubat C, Sagastume S, Gómez-Moracho T, Botías C, García-Palencia P, Martín-Hernández R, y col. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Vet Microbiol*. 2013b;162(2-4):670–8.
- Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792–7.
- EFSA - European Food Safety Authority [Internet]. European agency; 2015. [citado 18 Oct 2015]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/>
- Eiri DM, Suwannapong G, Endler M, Nieh JC. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126330.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;82(1):30–9.
- Ellis JD, Munn PA. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*. 2005;86(4):88–101.

- Ellis JD, Delaplane KS, Cline A, McHugh JV. The association of multiple sap beetle species (Coleoptera: Nitidulidae) with western honey bee (*Apis mellifera*) colonies in North America. *J Apic Res.* 2008;47(3):188–9.
- Ellis JD, Spiewok S, Delaplane KS, Buchholz S, Neumann P, Tedders WL. Susceptibility of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) larvae and pupae to entomopathogenic nematodes. *J Econ Entomol.* 2010;103(1):1–9.
- Elzen PJ, Baxter JR, Westervelt D, Randall C, Delaplane KS, Cutts L, y col. Field control and biology studies of a new pest species, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae), attacking European honey bees in the Western Hemisphere. *Apidologie.* 1999;30(5):361–6.
- Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M, Wilson WT. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie.* 2000;31(3):437–41.
- Emsen B, Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Eccles L, Lacey B, Ruiz-Pérez RA, y col. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitol Res.* 2015; DOI:10.1007/s00436-015-4733-3
- Endo A, Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 2013;36(6):444–8.
- Engels W, Rosenkranz P. Hypertermic experiences in control of varroatosis. *Apidologie.* 1992;23(4):380–1.
- EPILOBEE. A pan European epidemiological study on honeybee colony losses [Internet]. European Union Reference Laboratory for honeybee health; 2012-2013. [citado 18 Oct 2015]. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/docs/bee-report_en.pdf
- Erban T, Harant K, Hubalek M, Vitamvas P, Kamler M, Poltronieri P, y col. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci Rep.* 2015;5:13907.
- Erler S, Denner A, Bobiş O, Forsgren E, Moritz RFA. Diversity of honey stores and their impact on pathogenic bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecol Evol.* 2014;4(20):3960–7.
- Evans JD, Schwarz RS. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):614–20.
- Evans JD, Pettis JS, Smith IB. A diagnostic genetic test for the honey bee tracheal mite, *Acarapis woodi*. *J Apic Res.* 2007;46(3):195–7.
- Evans JD, Schwarz RS, Chen YP, Budge G, Cornman RS, De la Rúa P, y col. Standard

- methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. J Apic Res. 2013;52(4):1–54.
- Evison SEF, Fazio G, Chappell P, Foley K, Jensen AB, Hughes WOH. Host–parasite genotypic interactions in the honey bee: the dynamics of diversity. Ecol Evol. 2013;3(7):2214–22.
- Fakhimzadeh K. Potential of super-fine ground, plain white sugar dusting as an ecological tool for the control of Varroasis in the honey bee (*Apis mellifera*). Am bee J. 2000;140(6):487–91.
- Fakhimzadeh, K. Effectiveness of confectioner sugar dusting to knock down *Varroa destructor* from adult honey bees in laboratory trials. Apidologie. 2001;32(2):139–48.
- Faucon J-P, Aurières C, Drajnudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel A-C, y col. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Pest Manag Sci. 2005;61(2):111–25.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martín-Hernández R, Águila C. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Appl Environ Microbiol. 2009;75(21):6886–9.
- FEOGA - Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agrícola [Internet]. España: Ministerio de Hacienda y Administraciones Públicas; 2015 [citado 8 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.dgfc.sgp.g.meh.es/sitios/dgfc/es-ES/ipr/fcpp0006/fe/feoga/Paginas/inicio.aspx>
- Fievet J, Tentcheva D, Gauthier L, De Miranda J, Cousserans F, Colin ME, y col. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. Virol J. 2006;3(1):16.
- Flores JM, Ruiz JA, Ruz JM, Puerta F, Bustos M, Padilla F, y col. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. Apidologie. 1996;27(4):185–92.
- Flores JM, Puerta F, Gutiérrez I, Arrebola F. Estudio de la eficacia del Apimicos-b® en el control y la prevención de la ascosferiosis en la abeja de la miel. Rev Iberoam Micol. 2001;18(4):187–90.
- Flores JM, Spivak M, Gutiérrez I. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. Vet Microbiol. 2005;108(1-2):141–4.
- Forfert N, Natsopoulou ME, Frey E, Rosenkranz P, Paxton RJ, Moritz RFA. Parasites and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera*) and their influence on inter-colonial transmission. PLoS ONE. 2015;10(10):e0140337.

- Fontbonne R, Garnery L, Vidau C, Aufauvre J, Texier C, Tchamitchian S, y col. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect Genet Evol.* 2013;17:188–94.
- FAO - Food and Agriculture Organization. Rapid assessment of pollinators' status: A contribution to the international initiative for the conservation and sustainable use of pollinators [Internet]. 2008. [citado 20 Abr 2015]. Disponible en: http://www.fao.org/uploads/media/raps_2.pdf
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Internet]. 2009. [citado 18 Oct 2015]. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Forgách P, Bakonyi T, Tapaszi Z, Nowotny N, Rusvai M. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. *J Invertebr Pathol.* 2008;98(2):235–8.
- Forsgren E. European foulbrood in honey bees. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(1):S5–9.
- Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol.* 2010;170(3-4):212–7.
- Forsgren E, Fries I. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):78–82.
- Forsgren E, Lundhagen AC, Imdorf A, Fries I. Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European Foulbrood. *Microb Ecol.* 2005;50(3):369–74.
- Forsgren E, Stevanovic J, Fries I. Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Vet Microbiol.* 2008;129(3-4):342–9.
- Forsgren E, Budge GE, Charrière J-D, Hornitzky MAZ. Standard methods for European foulbrood research. *J Apic Res.* 2013;52(1).
- Francis R, Kryger P. Single assay detection of Acute Bee Paralysis Virus, Kashmir Bee Virus and Israeli Acute Paralysis Virus. *J Apic Sci.* 2012;56(1):137–46.
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS One.* 2013a;8(3):e57540.
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P. Patterns of viral infection in honey bee queens. *J Gen Virol.* 2013b;94(3):668–76.
- Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet J. M. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial

data. *Evolution*. 1998;52(4):1119–34.

Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M, Cornuet J. M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Mol Ecol*. 2000;9(7):907–21.

Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, y col. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 2001;86(4):420–30.

Frazier MT, Finley J, Harkness W, Rajotte EG. A sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J Econ Entomol*. 2000;93(3):551–8.

Free JB, Spencer-Booth Y. The longevity of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Proc R Entomol Soc Lond*. 1959;34(10-12):141–50.

Fries I. *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World*. 1993;74(1):5–19.

Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S73–9.

Fries I, Ekbohm G, Villumstad E. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *J Apic Res*. 1984;23(2):102–5.

Fries I, Camazine S, Sneyd J. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*. 1994;75(1):5–28.

Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a micosporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol*. 1996;32(3):356–65.

Fries I, Hansen H, Imdorf A, Rosenkranz P. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*. 2003;34(4):389–97.

Fries I, Chauzat M-P, Chen Y-P, Doublet V, Genersch E, Gisder S, y col. Standard methods for *Nosema* research. *J Apic Res*. 2013;52(1).

Fuchs S, Langenbach K. Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 1989;20(3):257–66.

Fujiyuki T, Takeuchi H, Ono M, Ohka S, Sasaki T, Nomoto A, y col. Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honey bees. *J Virol*. 2004;78(3):1093–100.

- Fujiyuki T, Ohka S, Takeuchi H, Ono M, Nomoto A, Kubo T. Prevalence and phylogeny of kakugo virus, a novel insect Picorna-Like virus that infects the honeybee (*Apis mellifera* L.), under various colony conditions. *J Virol*. 2006;80(23):11528–38.
- Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, Vucicevic M, Simeunovic P, y col. Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis. *Exp Appl Acarol*. 2013;61(1):97–105.
- Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ*. 2009;68(3):810–21.
- García-González E, Poppinga L, Fünfhaus A, Hertlein G, Hedtke K, Jakubowska A, y col. *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog*. 2014a;10(7):e1004284.
- García-González E, Müller S, Ensle P, Süssmuth RD, Genersch E. Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ Microbiol*. 2014b;16(5):1297–309.
- García-González E, Müller S, Hertlein G, Heid N, Süssmuth RD, Genersch E. Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Microbiologyopen*. 2014c;3(5):642–56.
- Garnery L, Vautrin D, Cornuet JM, Solignac M. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*. 1991;22(1):87–92.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol Ecol*. 1992;1(3):145–54.
- Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM. Mitochondrial-DNA variation in Moroccan and Spanish honey-bee populations. *Mol Ecol*. 1995;4(4):465–72.
- Garrido C, Rosenkranz P, Paxton RJ, Gonçalves LS. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*. 2003;34(6):535–41.
- Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal JL, Martínez-Salvador A, Barrios L, y col. Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Span J Agric Res*. 2010;8(3):658–61.
- Garrido-Bailón, E. Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos detectados en colonias de *Apis mellifera iberiensis*. Madrid: Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid; 2012.

- Garrido-Bailón E, Bartolomé C, Prieto L, Botías C, Martínez-Salvador A, Meana A, y col. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp Parasitol*. 2012;132(4):530–6.
- Garrido-Bailón E, Higes M, Martínez-Salvador A, Antúnez K, Botías C, Meana A, y col. The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb Biotechnol*. 2013;6(6):731–9.
- Gauthier L, Ravallec M, Tournaire M, Cousserans F, Bergoin M, Dainat B, y col. Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS One*. 2011;6(1):e16217.
- Gegeer RJ, Otterstatter MC, Thomson JD. Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques? *Anim Behav*. 2005;70(1):209–15.
- Genersch E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S10–9.
- Genersch E, Otten C. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*. 2003;34(3):195–206.
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7551–5.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, y col. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(3):501–11.
- Genersch E, Von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, y col. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 2010;41(3):332–52.
- Gerson U, Mozes-Koch R, Cohen E. Enzyme levels used to monitor pesticides resistance in *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res*. 1991;30(1):17–20.
- Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M, y col. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*. 2009;40(2):117–23.
- Gilliam M. Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 1986;17(2):93–100.
- Gilliam M, Shimanuki H. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee

- hemocytes. J Invertebr Pathol. 1967;9(3):387–9.
- Gilliam M, Taber S, Richardson GV. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. Apidologie. 1983;14(1):29–39.
- Gisder S, Genersch E. Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. PLoS One. 2015;10(2):e0117200.
- Gisder S, Hedtke K, Mockel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? Appl Environ Microbiol. 2010;76(9):3032–8.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M. Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. PLoS One. 2013;8(3):e58165.
- Gochnauer TA. Growth, protease formation and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. J Invertebr Pathol. 1973;22(2):251–7.
- Gochnauer TA, Hughes SJ. Detection of *Ascosphaera apis* in honey bee larvae (Hymenoptera: Apidae) from Eastern Canada. Can Entomol. 1976;108(9):985–8.
- Gochnauer TA, Margetts VJ. Decontaminating effect of ethylene oxide on honeybee larvae previously killed by chalkbrood disease. J Apic Res. 1980;19:261–4.
- Gómez-Moracho T, Bartolomé C, Bello X, Martín-Hernández R, Higes M, Maside X. Recent worldwide expansion of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in *Apis mellifera* populations inferred from multilocus patterns of genetic variation. Infect Genet Evol. 2015;31:87–94.
- Gómez A. Nosemiasis, varroasis. Situación actual. Vida Apícola. 1998;88:51–4.
- Goulson D. Bumblebees: behaviour, ecology, and conservation. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2010.
- Govan VA, Brozel V, Allsopp MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. Appl Environ Microbiol. 1998;64(5):1983–5.
- Govan VA, Allsopp MH, Davison S. A PCR Detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl Environ Microbiol. 1999;65(5):2243–5.
- Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, Karlsson OE, Kukielka D, Belák S, y col. Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: Co-infection by Aphid Lethal Paralysis, Israel Acute Paralysis and Lake Sinai viruses. PLoS One. 2013;8(2):e57459.

- Grangier V. Early detection of European foulbrood using real-time PCR. Switzerland: Vetsuisse faculty, University of Bern; 2011.
- Grant G, Nelson D, Olsen P, Rice WA. The ELISA detection of tracheal mites in whole honey bee samples. *Am bee J.* 1993;133:652–5.
- Greco MK, Hoffmann D, Dollin A, Duncan M, Spooner-Hart R, Neumann P. The alternative Pharaoh approach: stingless bees mummify beetle parasites alive. *Naturwissenschaften.* 2010;97(3):319–23.
- Guarna M, Melathopoulos AP, Huxter E, Iovinella I, Parker R, Stoyanov N, y col. A search for protein biomarkers links olfactory signal transduction to social immunity. *BMC Genomics.* 2015;16(1):63.
- Guzmán-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, McGowan J, Kelly PG, Correa-Benítez A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie.* 2010;41(4):443–50.
- Ha JS, Lee HM, Lee DB, Son WG, Lim YK, Yoon BS. Rapid identification of *Melissococcus plutonius* causing European foulbrood disease in honeybee by real-time PCR. *Korean Journal of Apiculture.* 2006;21:19-26.
- Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticida: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):12764–7.
- Halcroft M, Spooner-Hart R, Neumann P. Behavioral defense strategies of the stingless bee, *Austroplebeia australis*, against the small hive beetle, *Aethina tumida*. *Insectes Soc.* 2011;58(2):245–53.
- Halm M-P, Rortais A, Arnold G, Taséi JN, Rault S. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ Sci Technol.* 2006;40(7):2448–54.
- Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999;41:95–8.
- Hansen H, Petersen H. Residues in honey and wax after treatment of bee colonies with bromopropylate. *Danish Journal of Plant and Soil Science.* 1988;92:1–6.
- Hansen H, Brødsgaard CJ. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 1999;80(1):5–23.
- Han SH, Lee DB, Lee DW, Kim EH, Yoon BS. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood (AFB). *J Invertebr Pathol.* 2008;99(1):8–13.

- Harbo J. Field and laboratory tests that associate heat with mortality of tracheal mites. *J Apic Res.* 1993;32(3-4):159–65.
- Harrison JF, Camazine S, Marden JH, Kirkton SD, Rozo A, Yang X. Mite not make it home: tracheal mites reduce the safety margin for oxygen delivery of flying honeybees. *J Exp Biol.* 2001;204(4):805–14.
- Harris J, Harbo JR. Natural and suppressed reproduction of *Varroa*. *Bee Cult.* 2001;129:34–8.
- Heath LAF, Gaze BM. Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. *J Apic Res.* 1987;26(4):243–6.
- Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invertebr Pathol.* 2011;108(3):167–73.
- Hepburn HR, Radloff SE. Honey bees of Africa. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1998.
- Hernández GR. Trashumancia y variabilidad genética de las poblaciones de *Apis mellifera ibérica* (Hymenoptera, Apidae) de la región de Murcia. Murcia (España): Facultad de Veterinaria, Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Murcia; 2002.
- Hernández-López J, Crockett S, Kunert O, Hammer E, Schuehly W, Bauer R, y col. In vitro growth inhibition by *Hypericum* extracts and isolated pure compounds of *Paenibacillus larvae*, a lethal disease affecting honeybees worldwide. *Chem Biodivers.* 2014a;11(5):695–708.
- Hernández-López J, Schuehly W, Crailsheim K, Riessberger-Gallé U. Trans-generational immune priming in honeybees. *Proc Biol Sci.* 2014b;281(1785): 20140454.
- Hertlein G, Müller S, García-González E, Poppinga L, Süssmuth RD, Genersch E. Production of the catechol type siderophore Bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One.* 2014;9(9): e108272.
- Higes M, Llorente J, Sanz JA. *Varroa*. Sensibilidad al fluvalinato. *Vida Apícola.* 1998;89:41–5.
- Higes M, Martín R, Sanz A, Álvarez N, Sanz A, García P, y col. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola.* 2005;133:15–21.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol.* 2006;92(2):93–5.

- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J Invertebr Pathol. 2007a;94(3):211–7.
- Higes M, Esperón F, Sánchez-Vizcaíno JM. Short communication. First report of black queen-cell virus detection in honey bees (*Apis mellifera*) in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research. 2007b;5(3):322–5.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, y col. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse: Natural *Nosema ceranae* infection. Environ Microbiol. 2008a;10(10):2659–69.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-Palencia P, Meana A. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. J Invertebr Pathol. 2008b;97(1):76–8.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, García-Palencia P, Meana A. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fómites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. Environ Microbiol. 2008c;10(5):1374–9.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, y col. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. Environ Microbiol Rep. 2009a;1(2):110–3.
- Higes M, Martín-Hernández R, García-Palencia P, Marín P, Meana A. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). Environ Microbiol Rep. 2009b;1(6):495–8.
- Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Meana A, y col. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. Environ Microbiol Rep. 2010a;2(2):243–50.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie. 2010b;41(3):375–92.
- Higes M, García-Palencia P, Botías C, Meana A, Martín-Hernández R. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. Environ Microbiol Rep. 2010c;2(6):745–8.
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. Environ Microbiol Rep. 2013a;5(1):17–29.
- Higes M, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, y col. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). Environ Microbiol Rep. 2013b;5(4):530–6.

- Hirschfelder H, Sachs H. Recent research on the acarese mite. *Bee World*. 1952; 33(12):201–9.
- Hirst S. On the mite (*Acarapis woodi*, Rennie) associated with Isle of Wight bee disease. *Annals and Magazine of Natural History*. 1921;7(42):509–19.
- Hitchcock JD, Christensen M. Occurrence of chalkbrood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States. *Mycologia*. 1972;64(5):1193–8.
- Hitchcock JD, Stoner A, Wilson WT, Menapace DM. Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honeybee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Soc*. 1979;52:238–46.
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates - a new terminology. *Nature*. 1966;212(5068):1385–6.
- Hoffmann D, Pettis JS, Neumann P. Potential host shift of the small hive beetle (*Aethina tumida*) to bumblebee colonies (*Bombus impatiens*). *Insectes Soc*. 2008;55(2):153–62.
- Hornitzky MAZ. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *J Apic Res*. 1998;37(4):267–71.
- Hornitzky MAZ, Clark S. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J Apic Res*. 1991;30(1):13–6.
- Hornitzky MAZ, Nicholls PJ. J-medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J Apic Res*. 1993;32(1):51–2.
- Hornitzky MAZ, Smith L. The sensitivity of Australian *Melissococcus pluton* isolates to oxytetracycline hydrochloride. *Aust J Exp Agric*. 1999;39(7):881–3.
- Hrabák J, Martínek K. Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Apic Res*. 2007;46(3):160–4.
- Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Lattorff HMG, Kraus FB, Moritz RFA. Four quantitative trait loci associated with low *Nosema ceranae* (Microsporidia) spore load in the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2014;45(2):248–56.
- Hung ACF, Shimanuki H, Knox DA. Inapparent infection of acute bee paralysis virus and kashmir bee virus in US honey bees. *Am bee J*. 1996;136:874–6.
- Hunter W, Ellis J, VanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, y col. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli Acute Paralysis Virus disease in

honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). PLoS Pathog. 2010;6(12): e1001160.

Ifantidis MD. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey- bee brood cells. J Apic Res. 1983;22(3):200-206.

Ifantidis MD, Thrasyvoulou A, Pappas M. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. Apidologie. 1988;19(4):387–96.

Ifantidis MD, Karamanidou A, Katikou P. Juvenile mortality of the female descendants in the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in worker brood of *Apis mellifera*. J Apic Res. 1999;38(1-2):25–32.

Iqbal J, Mueller U. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. Proc Biol Sci. 2007;274(1617):1517–21.

James RR, Skinner JS. PCR diagnostic methods for *Ascosphaera* infections in bees. J Invertebr Pathol. 2005;90(2):98–103.

Jara L, Cepero A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M, De la Rúa P. Linking evolutionary lineage with parasite and pathogen prevalence in the Iberian honey bee. J Invertebr Pathol. 2012;110(1):8–13.

Jara L, Muñoz I, Cepero A, Martín-Hernández R, Serrano J, Higes M, y col. Stable genetic diversity despite parasite and pathogen spread in honey bee colonies. Naturwissenschaften. 2015;102(9-10):1298.

Jean-Prost P. Apicultura. Madrid: Mundi-Prensa; 1989.

Jensen AB, Welker DL, Kryger P, James RR. Polymorphic DNA sequences of the fungal honey bee pathogen *Ascosphaera apis*. FEMS Microbiol Lett. 2012;330(1):17–22.

Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M. Standard methods for fungal brood disease research. J Apic Res. 2013;52(1).

Jiménez JJ, Bernal JL, Del Nozal MJ, Martín MT. Residues of organic contaminants in beeswax. Eur J Lipid Sci Technol. 2001;107(12):896–902.

Johnson R. Honey bee colony collapse disorder [Internet]. Washington: Congressional Research Service; 2010 [citado 20 Abr 2015]. Disponible en: <http://curia.ihmc.us/rid=1JJM69DXL-27XB9CC-12CF/bees.pdf>

Johnson BR. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. Proc R Soc Lond B. 2003;270(1511):147–52.

- Johnson RN, Zaman MT, Decelle MM, Siegel AJ, Tarpy DR, Siegel EC, y col. Multiple micro-organisms in chalkbrood mummies: evidence and implications. *J Apic Res.* 2005;44(1):29–32.
- Jones D. A numerical taxonomic study of Coryneform and related bacteria. *J Gen Microbiol.* 1975;87(1):52–96.
- Jones JC, Oldroyd BP. Nest thermoregulation in social insects. *Adv In Insect Phys.* 2007;33:153–91.
- Jukes TH, Cantor CR. Evolution of Protein Molecules. En: Munro HN, editor. *Mammalian Protein Metabolism*. 3rd ed. New York (EEUU): Academic Press; 1969;21–132.
- Kanbar G, Engels W. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitol Res.* 2003;90(5):349–54.
- Kather R, Drijfhout FP, Shemilt S, Martin SJ. Evidence for passive chemical camouflage in the parasitic mite *Varroa destructor*. *J Chem Ecol.* 2015;41(2):178–86.
- Katznelson H. *Bacillus pulvifaciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J Bacteriol.* 1950;59(2):153–5.
- Katznelson H, Jamieson CA. Control of *Nosema* disease of honey-bees with fumagilin. *Science.* 1952;115(2977):70–1.
- Katznelson H, Robb JA. The use of gamma radiation from Cobalt 60 in the control of diseases of the honeybee and the sterilisation of honey. *Can J Microbiol.* 1962;8:175–9.
- Kerr EW, Lello E. Sting glands in stingless bees. A vestigial character (Hymenoptera: Apidae). *J N Y Entomol Soc.* 1962;70(4):190–214.
- Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, y col. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature.* 2015;521(7550):74–6.
- Khoury DS, Myerscough MR, Barron AB. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PLoS One.* 2011;6(4):e18491.
- Khoury DS, Barron AB, Myerscough MR. Modelling Food and population dynamics in honey bee colonies. *PLoS One.* 2013;8(5):e59084.
- Killer J, Dubna S, Sedlacek I, Svec P. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64(1):152–7.

- Kirchner WH. Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid ("Gaucho") on the behaviour of honey-bees. *Apidologie*. 1999;30(5):421-2.
- Klee J, Tek Tay W, Paxton RJ. Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. *J Invertebr Pathol*. 2006;91(2):98–104.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, y col. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*. 2007;96(1):1–10.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, y col. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci*. 2007;274(1608):303–13.
- Klinger EG, James RR, Youssef NN, Welker DL. A multi-gene phylogeny provides additional insight into the relationships between several *Ascosphaera* species. *J Invertebr Pathol*. 2013;112(1):41–8.
- Kloucek P, Smid J, Flesar J, Havlik J, Titera D, Rada V, y col. In vitro inhibitory activity of essential oil vapors against *Ascosphaera apis*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(2):253–6.
- Koch H, Weißer P. Exposure of honey bee during pesticide application under field conditions. *Apidologie*. 1997;28(6):439–47.
- Koenig JP, Bousch GM, Erickson Jr EH. Effect of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood in honeybee colonies. *J Apic Res*. 1987;26(3):191–5.
- Kojima Y, Toki T, Morimoto T, Yoshiyama M, Kimura K, Kadowaki T. Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan. *Microb Ecol*. 2011a;62(4):895–906.
- Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Kadowaki T. PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *J Invertebr Pathol*. 2011b;108(2):135–7.
- Komejli A, Gary NE, Page RE. Tracheal mite (Acari: Tarsonemidae) infestation effects on foraging and survivorship of honeys bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol*. 1989;82(3):734–9.
- Kralj J, Fuchs S. *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*. 2010;41(1):21–8.
- Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2007;193(3):363–70.

- Krantz GW, Walter DE. A manual of acarology. 3rd ed. Lubbock, Texas (EEUU): Texas Tech University Press; 2009.
- Kraus B. Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. J Apic Res. 1993;32(2):57–64.
- Kronenberg F, Heller CH. Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). J Comp Physiol. 1982;148(1):65–76.
- Krska D, Ravulapalli R, Fieldhouse RJ, Lugo MR, Merrill AR. C3larvin toxin, an ADP-ribosyltransferase from *Paenibacillus larvae*. J Biol Chem. 2015;290(3):1639–53.
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczyński W. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. Apidologie. 1999;30(6):521–32.
- Kuenen LPS, Calderone NW. Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: preferences for age- and function- specific adult bees. J Insect Behav. 1997; 10(2):213–228.
- Kukielka D, Esperón F, Higes M, Sánchez-Vizcaíno JM. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. J Virol Methods. 2008a;147(2):275–81.
- Kukielka D, Perez AM, Higes M, Bulboa MC, Sánchez-Vizcaíno JM. Analytical sensitivity and specificity of a RT-PCR for the diagnosis and characterization of the spatial distribution of three *Apis mellifera* viral diseases in Spain. Apidologie. 2008b;39(6):607–17.
- Lacey LA, Frutos HK, Vail P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biol Control. 2001;21(3):230–48.
- Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'Hostis M, Wiest L, y col. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. PLoS One. 2013;8(6):e67007.
- Lange CE. Protistas patógenos de insectos terrestres. En: Lecuona R. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina: Mariano Mas; 1996. 87–104pp.
- Langridge DF, McGhee RB. *Crithidia mellificae* n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. J Protozool. 1967;14(3):485–7.
- Lanzi G, De Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, y col. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). J Virol. 2006;80(10):4998–5009.

- Larsson R. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progress in Protistology*. 1986;1:325–90.
- Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassu M, Bertoloni G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol*. 2003;81(3):195–201.
- Leander BS. Marine gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation? *Trends Parasitol*. 2008;24(2):60–7.
- Leat N, Ball BV, Govan V, Davison S. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J Gen Virol*. 2000;81(8):2111–9.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B, Ourisson G. Attraction of the parasitic mite varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*. 1989;245(4918):638–9.
- Lee GM, McGee PA, Oldroyd BP. Variable virulence among isolates of *Ascosphaera apis*: testing the parasite–pathogen hypothesis for the evolution of polyandry in social insects. *Naturwissenschaften*. 2013;100(3):229–34.
- Le Faouder J, Bichon E, Brunschwig P, Landelle R, Andre F, Le Bizec B. Transfer assessment of fipronil residues from feed to cow milk. *Talanta*. 2007;73(4):710–7.
- Lello E. Adnexal glands of the sting apparatus of bees. *Anatomy and Histology I. Hymenoptera: Colletidae and Andrenidae*. *J Kans Entomol Soc*. 1971;44(1):14–20.
- Li J, Qin H, Wu J, Sadd BM, Wang X, Evans JD, y col. The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS One*. 2012;7(11):e47955.
- Li Z, Songkun S, Hamilton M, Yan L, Chen Y. The ability to cause infection in a pathogenic fungus uncovers a new biological feature of honey bee viruses. *J Invertebr Pathol*. 2014;120:18–22.
- Lindquist EE. The world genera of Tarsonemidae (Acari: Heterostigmata): A morphological, phylogenetic, and systematic revision, with a reclassification of family-group taxa in the Heterostigmata. *Mem Entomol Soc Can*. 1986;118(136):1–517.
- Lindström A, Fries I. Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res*. 2005;44(2):82–6.
- Lin H, Otis GW, Scott-Dupree C. Comparative resistance in Buckfast and Canadian stocks of honey bees (*Apis mellifera* L.) to infestation by honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi* Rennie). *Exp Appl Acarol*. 1996;20(2):87–101.

- Lipa JJ, Triggiani O. *Apicystis* gen. nov. and *Apicystis bombi* (Liu, Macfarlane & Pengelly) comb. nov. (Protozoa: Neogregarinida), a cosmopolitan parasite of *Bombus* and *Apis* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*. 1996;27(1):29–34.
- Liu TP. Ultrastructure of the midgut of the worker honeybee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *J Invertebr Pathol*. 1984;44(3):282–91.
- Liu TP. Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue Cell*. 1990;22(4):523–31.
- Llorente, J. Estudios sobre el tratamiento y control químico de la infestación por *Varroa jacobsoni* Oud. en Castilla-La Mancha. León: Universidad de León; 1993.
- Llorente, J. Principales enfermedades de las abejas. España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; 2003.
- Lodesani M, Pellacani A, Bergomi S, Carpana E, Rabitti T, Lasagni P. Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie*. 1992;23(3):257–72.
- Lodesani M, Colombo M, Spreafico M. Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*. 1995;26(1):67–72.
- Lodesani M, Costa C, Besana A, Dall'Olio R, Franceschetti S, Tesoriero D, y col. Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J Apic Res*. 2014;53(1):155–64.
- Lotmar R. Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifica*) während der Überwinterung. *Landwirtschaftl Jb der Schweiz*. 1939;53:33–71.
- Maasen A. Weitere Mitteilungen über die Seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen. *Mitt Biol Zent Anst*. 1913;14:48–58.
- Macfarlane RP, Lipa JJ, Liu HJ. Bumble bee pathogens and internal enemies. *Bee World*. 1995;76(3):130–48.
- Maggi MD, Ruffinengo SR, Negri P, Eguaras MJ. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitol Res*. 2010;107(5):1189–92.
- Maggi MD, Medici S, Quintana S, Ruffinengo SR, Marcángeli J, Gimenez Martínez P, y col. Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina. *Exp Appl Acarol*. 2012;56(4):309–18.

- MAGRAMA - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente [Internet]. Gobierno de España; 2013 [citado 8 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/>
- Maharramov J, Meeus I, Maebe K, Arbetman M, Morales C, Graystock P, y col. Genetic variability of the neogregarine *Apicystis bombi*, an etiological agent of an emergent bumblebee disease. PLoS One. 2013;8(12):e81475.
- Maistrello L, Lodesani M, Costa C, Leonardi F, Marani G, Caldon M, y col. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). Apidologie. 2008;39(4):436–45.
- Mallon EB, Loosli R, Schmid-Hempel P. Specific versus nonspecific immune defense in the bumblebee, *Bombus terrestris* L. Evolution. 2003;57(6):1444–7.
- Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, y col. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. J Gen Virol. 2007a;88(12):3428–38.
- Maori E, Tanne E, Sela I. Reciprocal sequence exchange between non-retro viruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. Virology. 2007b;362(2):342–9.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, y col. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. Insect Mol Biol. 2009;18(1):55–60.
- Martin SJ. Ontogenesis of the mite *Varroa Jacobsoni* Oud. In worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp Appl Acarol. 1994;18(2):87–100.
- Martin SJ. Reproduction of *Varroa jacobsoni* in cells of *Apis mellifera* containing one or more mother mites and the distribution of these cells. J Apic Res. 1995;34(4):187–96.
- Martin SJ. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: A modelling approach. J Appl Ecol. 2001;38(5):1082–93.
- Martin S, Hogarth A, Van Breda J, Perrett J. A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* L. colonies in the United Kingdom. Apidologie. 1998;29(4):369–70.
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, y col. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. Science. 2012;336(6086):1304–6.

- Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martín-Hernández R, Nikaido S, Higes M. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(4):506–10.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(20):6331–8.
- Martín-Hernández R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, y col. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(8):2554–7.
- Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, y col. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol*. 2012;14(8):2127–38.
- Martínez AR, Cordero M. El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. En: Cordero M, Rojo FA, editores. *Parasitología Veterinaria*. Madrid: Ed. McGraw-Hill Interamericana de España; 1999.
- Martínez J, Simon V, González B, Conget P. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50(6):603–10.
- Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(3):397–402.
- Matheson A. World bee health report. *Bee World*. 1993;74(4):176–212.
- Mathieu L, Faucon JP. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *J Apic Res*. 2000;39(3-4):155–8.
- Maurizio A. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World*. 1950;31(2):9–12.
- Mayack C, Natsopoulou ME, McMahon DP. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Mol Biol*. 2015; DOI: 10.1111/imb.12190
- McCowen MC, Callender ME, Lawlis JF. Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties. *Science*. 1951;113(2930):202–3.
- McDonnell CM, Alaux C, Parrinello H, Desvignes J-P, Crauser D, Durbesson E, y col. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the

honey bee (*Apis mellifera*). BMC Ecol. 2013;13(1):25.

McFrederick QS, Mueller UG, James RR. Interactions between fungi and bacteria influence microbial community structure in the *Megachile rotundata* larval gut. Proc Biol Sci. 2014;281(1779):20132653.

McGregor SE. Insect pollination of cultivated crop plants. Washington DC: US Department of Agriculture; 1976.

McKee BA, Djordjevic SP, Goodman RD, Hornitzky MA. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie. 2003;34(1):19–27.

McKee BA, Goodman RD, Hornitzky MA. The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). J Apic Res. 2004;43(3):93–100.

McMullan JB, Brown MJF. A qualitative model of mortality in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with tracheal mites (*Acarapis woodi*). Exp Appl Acarol. 2009;47(3):225–34.

McMullan JB, D'ettorre P, Brown MJF. Chemical cues in the host-seeking behaviour of tracheal mites (*Acarapis woodi*) in honey bees (*Apis mellifera mellifera*). Apidologie. 2010;41(5):568–78.

Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. J Apic Res Bee World. 2010;49(2):212–4.

Medina ML, May IW. Enfermedades de las abejas. Mérida (México): Universidad Autónoma de Yucatán; 2005.

Meeus I, De Graaf DC, Jans K, Smagghe G. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. J Appl Microbiol. 2010;109(1):107–15.

Meeus I, Brown MJF, De Graaf DC, Smagghe G. Effects of invasive parasites on bumble bee declines. Conserv Biol. 2011;25(4):662–71.

Meixner MD, Francis RM, Gajda A, Kryger P, Andonov S, Uzunov A, y col. Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. J Apic Res. 2014;53(2):215–29.

Meusel MS, Moritz RFA. Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs. Curr Genet. 1993;24(6):539–43.

Mihai CM, Mărghițaș LA, Dezmirean DS, Chirilă F, Moritz RF, Schlüns H. Interactions among

- flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*. J Invertebr Pathol. 2012;110(1):68–72.
- Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. Apidologie. 1995;26(5):415–29.
- Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie. 1999;30(2-3):229–34.
- Milbrath MO, Van Tran T, Huang W-F, Solter LF, Tarpy DR, Lawrence F, y col. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol. 2015;125:9–15.
- Miyagi T, Peng CYS, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH. Verification of oxytetracycline resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. J Invertebr Pathol. 2000;75(1):95–6.
- Moeller FE. *Nosema* disease – its control in honey bee colonies. Washington (EEUU): Department of Agricultural Technical Bulletin n° 1569; 1978.
- Mondragón L, Spivak M, Vandame R. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie. 2005;36(3):345–58.
- Mondragón L, Martin S, Vandame R. Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. Apidologie. 2006;37(1):67–74.
- Moore J, Jironkin A, Chandler D, Burroughs N, Evans DJ, Ryabov EV. Recombinants between deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. J Gen Virol. 2011;92(1):156–61.
- Morgenthaler O. An Acarine disease experimental apiary in the Bernese Lake District and some of the results obtained there. Bee World. 1931;12(1):8–10.
- Morgenthaler D. Die ansteckende Frühjahrsschwindsucht (*Nosema-Amoeben-Infektion*) der Bienen. Erweiterter Sonderdruck aus der Schweizerischen Bienenzeitung Heft. 1939;2:3-4.
- Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Peng G, y col. Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. Environ Microbiol Rep. 2013;5(1):74–7.
- Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. Environ Microbiol. 2015;17(4):1414-24.

- Morse RA, Calderone NW. The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Cult.* 2000;128:1–15.
- Mozes-Koch R, Gerson U. Guanine visualization: a new method for diagnosing tracheal mite infestation of honey bees. *Apidologie.* 1997;28(1):3–9.
- Müller S, García-González E, Mainz A, Hertlein G, Heid NC, Mösker E, y col. Paenilamicin: Structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Angew Chem Int Ed.* 2014;53(40):10821–5.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, y col. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS One.* 2010;5(3):e9754.
- Muñoz I, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M, De la Rúa P. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *J Apic Res Bee World.* 2008;47(4):310–3.
- Muñoz I, Cepero A, Pinto MA, Martín-Hernández R, Higes M, De la Rúa P. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infect Genet Evol.* 2014;23:161–8.
- Murray A. List of *Coleoptera* received from Old Calabar, on the west coast of Africa. *The Annals and Magazine of Natural History.* 1867;19:167-180.
- Murray KD, Aronstein KA. Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *J Apic Res.* 2006;45(4):207–14.
- Murray KD, Aronstein KA, Jones WA. A molecular diagnostic method for selected *Ascosphaera* species using PCR amplification of internal transcribed spacer regions of rDNA. *J Apic Res.* 2005;44(2):61–4.
- Mutanen M, Hausmann A, Hebert PDN, Landry J-F, de Waard JR, Huemer P. Allopatry as a gordian knot for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *PLoS One.* 2012;7(10):e47214.
- Mutinelli F, Montarsi F, Federico G, Granato A, Ponti AM, Grandinetti G, y col. Detection of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae.) in Italy: outbreaks and early reaction measures. *J Apic Res.* 2014;53(5):569–75.
- Nars ME, Otis GW, Scott-Dupree CD. Resistance to *Acarapis woodi* by honey bees (Hymenoptera: Apidae): divergent selection and evaluation of selection progress. *J Econ Entomol.* 2001;94(2):332–8.

- Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Bryden J, Paxton RJ. Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;282(1798):20141896.
- Naug D. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biol Lett.* 2014;10(11):20140731.
- Navajas M, Anderson DL, De Guzmán LI, Huang ZY, Clement J, Zhou T, y col. New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture. *Apidologie.* 2010;41(2):181–93.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, y col. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog.* 2012;8(6):e1002735.
- Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* 1986;3:418–426.
- Neira M. Problemas de la nosemosis en Chile: factores predisponentes y estrategias para el manejo de la enfermedad. En: IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Apícola Facultad de Agronomía Universidad Católica de Valparaíso; 1994. p. 1-14.
- Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology.* 2004;150(7):2381–90.
- Neumann P, Elzen PJ. The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie.* 2004;35(3):229-47.
- Neumann P, Ritter W. A scientific note on the association of *Cychramus luteus* (Coleoptera: Nitidulidae) with honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Apidologie.* 2004;35(6):665-6.
- Neumann P, Ellis J. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae) distribution, biology and control of an invasive species. *J Apic Res.* 2008;47(3):181–3.
- Neumann P, Evans JD, Pettis JS, Pirk CW, Schäfer MO, Tanner G, y col. Standard methods for small hive beetle research. *J Apic Res.* 2013; 52(4): 1-32.
- Nguyen BK, Saegerman C, Pirard C, Mignon J, Widart J, Thirionet B, y col. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J Econ Entomol.* 2009;102(2):616–23.
- Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell

virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*. 2008;39(3):310–4.

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H. Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the International Sequence Databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinform Online*. 2008;4:193–201.

Nixon M. Preliminary world maps of honey bee diseases and parasites. *Bee World*. 1982;63(1):23–42.

Nordström S, Fries I. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J Apic Res*. 1995;34(2):97–103.

Nozal MJ, Bernal JL, Martín MT, Bernal J, Álvaro A, Martín-Hernández R, y col. Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2008;1190(1-2):224–31.

Ochoa R, Pettis JS, Mireles OM. A new bee mite of the genus *Pseudacarapis* (Acari: Tarsonemidae) from Mexico. *Int J Acarology*. 2003;29(4):299–305.

Ochoa R, Pettis JS, Erbe E, Wergin WP. Observations on the honey bee tracheal mite *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) using low-temperature scanning electron microscopy. *Exp Appl Acarol*. 2005;35(3):239–49.

OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.7 Varroosis of honey bees [Internet]. *Terrestrial Manual*; 2008a [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.07_VARROOSIS.pdf

OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.1 Acarapisosis of honey bees [Internet]. *Terrestrial Manual*; 2008b [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.01_ACARAPISOSIS.pdf

OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.4 Nosemosis of honey bees [Internet]. *Terrestrial Manual*; 2008c [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMONOSEMOSIS.pdf

OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.3. European foulbrood of honey bees [Internet]. *Terrestrial Manual*; 2008d [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.03_EUROPEAN_FOULBROOD.pdf

- OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.6. Tropilaelaps infestation of honey bees [Internet]. Terrestrial Manual; 2008e [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.06_TROPILAEELAPS.pdf
- OIE - Informe de la reunión del Grupo *Ad hoc* encargado de las enfermedades de las abejas melíferas [Internet]. Paris: Organización Internacional de Epizootias; 2010. [citado 18 Oct 2015] Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D7058.PDF>
- OIE - World Organisation for Animal Health. Capítulo 2.2.4 Nosemosis de las abejas melíferas [Internet]. Terrestrial Manual; 2013a [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf
- OIE - World Organisation for Animal Health. Capítulo 2.2.5 Small hive beetle infestation (*Aethina tumida*) [Internet]. Terrestrial Manual; 2013b [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.05_SMALL_HIVE_BEETLE.pdf
- OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.2. American foulbrood of honey bees [Internet]. Terrestrial Manual; 2014a [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
- OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 2.2.3. European foulbrood of honey bees [Internet]. Terrestrial Manual; 2014b [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.03_EUROPEAN_FOULB.pdf
- OIE - World Organisation for Animal Health. Chapter 9.3. Infection of honey bee with *Melissococcus plutonius* (European foulbrood) [Internet]. Terrestrial Animal Health Code; 2014c [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: http://wahis2-devt.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/chapitre_melissococcus_plutonius.pdf
- OIE - Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE 2015 [Internet]. Organización Mundial de Sanidad Animal; 2015 [citado 21 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/>
- Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, y col. Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. J Bacteriol. 2011;193(15):4029–30.
- Oldroyd BP. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Trends Ecol Evol. 1999;14(8):312–5.

- Oldroyd BP, Wongsiri S. Asian honey bees: biology, conservation and human interactions. Cambridge: Harvard University Press; 2006.
- Olsen PE, Grant GA, Nelson DL, Rice WA. Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. Can J Microbiol. 1990;36(10):732–5.
- Ongus JR. *Varroa destructor* virus 1: A new picorna-like virus in varroa mites as well as honey bees. Netherlands: Wageningen University; 2006.
- Ongus JR, Peeters D, Bonmatin JM, Bengsch E, Vlak JM, Van Oers MM. Complete sequence of a picorna-like virus of the genus *Iflavirus* replicating in the mite *Varroa destructor*. J Gen Virol. 2004;85(12):3747–55.
- Orden APA/735/2008, de 14 de marzo, por la que se modifica el anexo II del Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las muñecas de la miel. Boletín Oficial del Estado 68, 19 de marzo de 2008.
- Otte E. Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. Apidologie. 1973;4(4):331–9.
- Palacio MA, Figini EE, Ruffinengo SR, Rodriguez EM, Del Hoyo ML, Bedascarrasbure EL. Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. Apidologie. 2000;31(4):471–8.
- Palmer MR, Smith DR, Kaftanoglu O. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. J Hered. 2000;91(1):42–6.
- Paxton R, Klee J, Korpela S, Fries I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie. 2007;38(6):558–65.
- Peng YS, Peng KY. A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybee (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol. 1979;33(3):284–9.
- Peng YS, Nasr ME. Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. J Invertebr Pathol. 1985;46(3):325–31.
- Perry CJ, Søvik E, Myerscough MR, Barron AB. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(11):3427–32.
- Peters M, Kilwinski J, Beringhoff A, Reckling D, Genersch E. American foulbrood of the

- honey bee: Occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006;53(2):100–4.
- Pettis JS, Wilson WT. Life history of the honey bee tracheal mite (Acari: Tarsonemidae). *Ann Entomol Soc Am*. 1996;89(3):368–74.
- Pettis JS, Pankiw T. Grooming behaviour by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae). *Apidologie*. 1998;29(3):241–53.
- Pettis JS, Wilson WT, Eischen FA. Nocturnal dispersal by female *Acarapis woodi* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp Appl Acarol*. 1992;15(2):99–108.
- Pettis JS, VanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*. 2012;99(2):153–8.
- Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, VanEngelsdorp D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One*. 2013;8(7):e70182.
- Phelan PL, Smith AW, Needham GR. Mediation of host selection by cuticular hydrocarbons in the honeybee tracheal mite *Acarapis woodi* (Rennie). *J Chem Ecol*. 1991;17(2):463–73.
- Pilling E, Campbell P, Coulson M, Ruddle N, Tornier I. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS One*. 2013;8(10):e77193.
- Pinnock DE, Featherstone NE. Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Apic Res*. 1984;23(3):168–70.
- Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, y col. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015;22(1):68–102.
- Plischuk S, Lange CE. Invasive *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) parasitized by a flagellate (Euglenozoa: Kinetoplastea) and a neogregarine (Apicomplexa: Neogregarinorida). *J Invertebr Pathol*. 2009;102(3):263–5.
- Plischuk S, Meeus I, Smagghe G, Lange CE. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environ Microbiol Rep*. 2011;3(5):565–8.
- Poggeler S. Mating-type genes for classical strain improvements of *Ascomycetes*. *Appl*

- Microbiol Biotechnol. 2001;56(5-6):589–601.
- Popa A. *Varroa* disease of honeybee. Bulletin of OIE. 1985;93:1423–38.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol. 2010;25(6):345–53.
- Prier KRS, Lighthart B, Bromenshenk JJ. Adsorption model of aerosolized bacterial spores (*Bacillus subtilis* variety niger) onto free-flying honey bees (Hymenoptera: Apidae) and its validation. Environ Entomol. 2001;30(6):1188–94.
- Ptaszyńska AA, Borsuk G, Woźniakowski G, Gnat S, Małek W. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees. FEMS Microbiol Lett. 2014;357(1):40–8.
- Puerta F, Flores JM, Bustos M, Padilla F, Campano F. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. Apidologie. 1994;25(6):540–6.
- Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Insect Journal of Molecular Biology. 2006;15(5):715–8.
- Raffiudin R, Crozier RH. Phylogenetic analysis of honey bee behavioural evolution. Mol Phylogenet Evol. 2007;43(2):543–52.
- Ragsdale D, Furgala B. A serological approach to the detection of *Acarapis woodi* parasitism in honey bees using an enzyme-linked immunosorbent assay. Apidologie. 1987;18(1):1–10.
- Ragsdale D, Kjer KM. Diagnosis of tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie) parasitism of honey bees using a monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay. Am bee J. 1989;129:550–3.
- Raine NE, Gill RJ. Tasteless pesticides affect bees in the field. Nature. 2015;521:38–40.
- Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams y Wilkins; 1965.
- Rasolofoarivao H, Clémencet J, Ravaomanarivo LHR, Razafindrazaka D, Reynaud B, Delatte H. Spread and strain determination of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Madagascar since its first report in 2010. Exp Appl Acarol. 2013;60(4):521–30.
- Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E. Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honey bees. Appl Environ Microbiol. 2009;75(10):3344–7.

- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, y col. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellifica* as a new contributory factor to winter mortality. PLoS One. 2013;8(8):e72443.
- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, De Graaf DC. Vertical transmission of honey bee viruses in a Belgian queen breeding program. BMC Vet Res. 2015a;11:61.
- Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T, Yañez O, Tozkar CO, Martín-Hernández R, y col. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellifica* and *Lotmaria passim*. J Invertebr Pathol. 2015b;130:21–7.
- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, De Graaf DC. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. Virus Res. 2015c;201:67–72.
- Real Decreto 4/2001, de 12 de enero, por el que se establece un régimen de ayudas a la utilización de métodos de producción agraria compatibles con el medio ambiente. Boletín Oficial del Estado 12, 13 de enero de 2001.
- Real Decreto 209/2002, de 22 de febrero, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones apícolas. Boletín Oficial del Estado 62, 13 de marzo de 2002.
- Real Decreto 708/2002, de 19 de julio, por el que se establecen medidas complementarias al Programa de Desarrollo Rural para las Medidas de Acompañamiento de la Política Agraria Común. Boletín Oficial del Estado 175, 23 de julio de 2002.
- Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas. Boletín Oficial del Estado 89, 13 de abril de 2004.
- Real Decreto 448/2005, de 22 de abril, por el que se modifican el Real Decreto 519/1999, de 26 de marzo, por el que se regula el régimen de ayudas a la apicultura en el marco de los programas nacionales anuales, y el Real Decreto 209/2002, de febrero, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones apícolas. Boletín Oficial del Estado 109, 7 de mayo de 2005.
- Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de enfermedades de las abejas de la miel. Boletín Oficial del Estado 131, 2 de junio de 2006.
- Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. Boletín Oficial del Estado 118, 17 de mayo de 2007.
- Real Decreto 526/2014, de 20 de junio, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación.

Boletín Oficial del Estado 167, 10 de julio de 2014.

REGA - Registro General de Explotaciones Ganaderas [Internet]. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; 2014 [citado 8 Jun 2015]. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/registro/>

Reglamento (CE) N° 1221/1997 del Consejo de 25 de junio de 1997 por el que se establecen las normas generales de aplicación de las medidas destinadas a mejorar la producción y comercialización de la miel. Diario Oficial de la Unión Europea L173, 1 de julio de 1997.

Reglamento (CE) N° 2300/1997 de la Comisión de 20 de noviembre de 1997 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento 1221/1997 del consejo por el que se establecen las normas generales de aplicación de las medidas destinadas a mejorar la producción y comercialización de la miel. Diario Oficial de la Unión Europea L 319, 21 de noviembre de 1997.

Reglamento (CE) N° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea L 273, 10 de octubre de 2002.

Reglamento (CE) N° 797/2004 del Consejo de 26 de abril de 2004 relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 125/1, 28 de abril de 2004.

Reglamento (CE) N° 917/2004 de la Comisión de 29 de abril de 2004 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 797/2004 del Consejo relativo a las medidas en el sector de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 163/83, 30 de abril de 2004.

Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del consejo se 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L 70/1 de 16 de marzo de 2005.

Reglamento (CE) N° 178/2006 de la Comisión de 1 de febrero de 2006 por lo que se modifica el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo con vistas a establecer el anexo I que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican contenidos máximos de residuos de plaguicidas. Diario Oficial de la Unión Europea L 29/3, 2 de febrero de 2006.

Reglamento (CE) N° 811/2007 de la Comisión de 11 de julio de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 797/2004 del Consejo, relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos de la

apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 182/5, 12 de julio de 2007.

Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007 por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). Diario Oficial de la Unión Europea L 299/1, de 16 de noviembre de 2007.

Reglamento (CE) N° 839/2008 de la Comisión de 31 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los anexos II, III y IV relativos a los límites máximos de residuos de plaguicidas en el interior o en la superficie de determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 234/1, de 30 de agosto de 2008.

Reglamento (CE) N° 256/2009 de la Comisión de 23 de marzo de 2009 por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de azoxistrobina y fludioxonil en determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 81/3, de 27 de marzo de 2009.

Reglamento (CE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea L 15/1 de 20 de enero de 2010.

Reglamento (UE) N° 206/2010 de la Comisión de 12 de marzo de 2010 por el que se establecen listas de terceros países, territorios o bien partes de terceros países o territorios autorizados a introducir en la Unión Europea determinados animales o carne fresca y los requisitos de certificación veterinaria. Diario Oficial de la Unión Europea L 73/1 de 20 de marzo de 2010.

Reglamento (CE) N° 459/2010 de la Comisión del 27 de mayo de 2010 por el que se modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 129/3 de 28 de mayo de 2010.

Reglamento (CE) N° 726/2010 de la Comisión del 12 de agosto de 2010 que modifica el Reglamento (CE) N° 917/2004, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) N° 797/2004 del Consejo relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos del sector de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 213/29 de 13 de agosto de 2010.

Reglamento de Ejecución (UE) N° 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del

Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. Diario Oficial de la Unión Europea L 153/1 de 11 de junio de 2011.

Reglamento de Ejecución (UE) N° 485/2013 de la Comisión de 24 de mayo de 2013 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) N° 540/2011 en lo relativo a las condiciones de aprobación de las sustancias activas clotianidina, tiametoxam e imidacloprid, y se prohíben el uso y la venta de semillas tratadas con productos fitosanitarios que las contengan. Diario Oficial de la Unión Europea L 139/12 de 25 de mayo de 2013.

Reglamento de Ejecución (UE) N° 781/2013 de la Comisión de 14 de agosto de 2013 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) N° 540/2011 en lo relativo a las condiciones de aprobación de la sustancia activa fipronil, y se prohíben el uso y la venta de semillas tratadas con productos fitosanitarios que la contengan. Diario Oficial de la Unión Europea L 219/22 de 15 de agosto de 2013.

Rehm S-M, Ritter W. Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequences for the calculation of the developmental period. *Apidologie*. 1989;20(4):339–43.

Rehner SA, Evans JD. Microsatellite loci for the fungus *Ascosphaera apis*: cause of honey bee chalkbrood disease. *Mol Ecol Resour*. 2009;9(3):855–8.

Reybroeck W, Daeseleire E, De Brabander HF, Herman L. Antimicrobials in beekeeping. *Vet Microbiol*. 2012;158(1–2):1–11.

Reyes MG, Torres MJ, Maggi MD, Marioli JM, Gil RR, Sosa VE, y col. *In vitro* inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from *Flourensia spp*. *Industrial Crops and Products*. 2013;50:758–63.

Ribi  re M, Olivier V, Blanchard P. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S120–31.

Rice ND, Winston ML, Whittington R, Higo HA. Comparison of release mechanisms for botanical oils to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol*. 2002;95(2):221–6.

Riessberger-Gall   U, Von der Ohe W, Crailsheim K. Adult honeybee’s resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. *J Invertebr Pathol*. 2001;77(4):231–6.

Rinderer TE, Danka RG, Johnson S, Bourgeois AL, Frake AM, Villa JD, y col. Functionality of Varroa-resistant honey bees (Hymenoptera: Apidae) when used for western U.S. honey production and almond pollination. *J Econ Entomol*. 2014;107(2):523–30.

- Ritter W, Kiefer BM. A method for diagnosing *Bacillus larvae* in honey samples. *Animal Research and Development*. 1995;42:7–13.
- Ritter W. *Enfermedades de las abejas*. Zaragoza (España): Acribia; 2001.
- Rivas-Martínez S. *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Madrid: ICONA; 1987.
- Rivière MP, Ribière M, Chauzat MP. Recent molecular biology methods for foulbrood and noseosis diagnosis. *Rev Sci Tech*. 2013;32(3):885–92.
- Robinson GE, Ben-Sahar Y. Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes Brain Behavior*. 2002;1(4):197–203.
- Rodríguez-Dehaibes SR, Otero-Colina G, Pardio V, Villanueva JA. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *J Apic Res*. 2005;44(3):124–5.
- Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*. 2008;39(3):362–71.
- Rortais A, Arnold G, Halm M-P, Touffet-Briens F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*. 2005;36(1):71–83.
- Rortais A, Tentcheva D, Papachristoforou A, Gauthier L, Arnold G, Colin ME, y col. Deformed wing virus is not related to honey bees' aggressiveness. *Virology*. 2006;3:61.
- Rösch GA. Über die Bautätigkeit im Bienenvolk und das Alter der Baubienen. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*. 1927;6(2):264–98.
- Rosenkranz P. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie*. 1999;30(2-3):159–72.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S96–119.
- Rothenbuhler W. Behavior genetics of nest cleaning behaviour in honeybees I. Response of four inbred lines to disease killed brood. *Anim Behav*. 1964;12(4):578–83.
- Roudel M, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F, Blot N. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on multilocus sequence analysis. *Parasitology*. 2013;140(11):1346–56.

- Royce LA, Rossignol PA. Sex bias in tracheal mite [*Acarapis woodi* (Rennie)] infestation of honey bees (*Apis mellifera* L.). Bee Science. 1991;1(3):159–61.
- Royce LA, Krantz GW, Ibay LA, Burgett DM. Some observations on the biology and behaviour of *Acarapis woodi* and *Acarapis dorsalis* in Oregon. En: Needham GR, Page RE, Delifnado-Baker M, Bowman CE, Edotors. Africanized honey bees and bee mites. Chichester (UK): Ellis Horwood; 1988. p. 498–505.
- Royce LA, Rossignol PA, Burgett DM, Stringer BA. Reduction of tracheal mite parasitism of honey bees by swarming. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1991;331(1260):123–9.
- Ruano MV, Fernández FM, Ochoa AC, Valenzuela. Varroasis disturbs the orientation of bees its influence on parasitosis development. Vida Apícola. 1991;48:55–7.
- Rueckert S, Leander BS. Morphology and molecular phylogeny of *Haplozoon praxillellae* n. sp. (Dinoflagellata): a novel intestinal parasite of the maldanid polychaete *Praxillella pacifica* Berkeley. Eur J Protistol. 2008;44(4):299–307.
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, y col. A higher level classification of all living organisms. PLoS ONE. 2015;10(4):e0119248.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, y col. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. PLoS One. 2011;6(6):e20656.
- Runckel C, DeRisi J, Flenniken ML. A draft genome of the honey bee Trypanosomatid parasite *Crithidia mellificae*. PLoS One. 2014;9(4):e95057.
- Rutrecht ST, Brown MJF. The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens. Int J Parasitol. 2008;38(7):799–808.
- Ruttner F, Tassenco U, Louveaux J. Biometrical statistical analisis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. Apidologie. 1978;9(4):363–81.
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Berlín: Springer-Verlag; 1988.
- Ryabov EV, Wood GR, Fannon JM, Moore JD, Bull JC, Chandler D, y col. A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. PLoS Pathog. 2014;10(6):e1004230.
- Sadd BM. Food-environment mediates the outcome of specific interactions between a bumblebee and its trypanosome parasite. Evolution. 2011;65(10):2995–3001.
- Sammataro D, Needham GR. How oil affects the behavior of tracheal mites. Am bee J. 1996;136(7):511–4.

- Sammataro D, Gerson U, Needham G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annu Rev Entomol.* 2000;45:519–48.
- Sammataro D, De Guzman L, George S, Ochoa R, Otis G. Standard methods for tracheal mite research. *J Apic Res.* 2013;52(4):1–20.
- Sánchez Collado JG, Higes M, Barrio L, Martín-Hernández R. Flow cytometry analysis of *Nosema* species to assess spore viability and longevity. *Parasitol Res.* 2014;113(5):1695–701.
- Santillán-Galicia MT, Carzaniga R, Ball BV, Alderson PG. Immunolocalization of deformed wing virus particles within the mite *Varroa destructor*. *J Gen Virol.* 2008;89(7):1685–9.
- Saraithong P, Li Y, Saenphet K, Chen Z, Chantawannakul P. Bacterial community structure in *Apis florea* larvae analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequencing. *Insect Sci.* 2015;22(5):606–18.
- Schäfer MO, Pettis JS, Ritter W, Neumann P. A scientific note on quantitative diagnosis of small hive beetles, *Aethina tumida*, in the field. *Apidologie.* 2008;39(5):564–5.
- Schäfer MO, Ritter W, Pettis JS, Neumann P. Winter losses of honeybee colonies (Hymenoptera: Apidae): The role of infestations with *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) and *Varroa destructor* (Parasitiformes: Varroidae). *J Econ Entomol.* 2010;103(1):10–6.
- Schäfer MO, Genersch E, Fünfhaus A, Poppinga L, Formella N, Bettin B, y col. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet Microbiol.* 2014;170(3–4):291–7.
- Schmid-Hempel P. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften.* 2001;88(4):147–58.
- Schmid-Hempel R, Tognazzo M. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J Eukaryot Microbiol.* 2010;57(4):337–45.
- Schneider CW, Tautz J, Grünwald B, Fuchs S. RFID Tracking of sublethal effects of two Neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One.* 2012;7(1):e30023.
- Schneider P, Drescher W. Action de *Varroa jacobsoni* sur le poids à l'émergence le développement des glandes hypopharyngiennes et la longévité d'*Apis mellifera*. *Apidologie.* 1987;18:101–10.

- Schuch DMT, Madden RH, Satler A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. J Apic Res. 2001;40(2):59–64.
- Schwarz RS, Evans JD. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. Dev Comp Immunol. 2013;40(3-4):300–10.
- Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, De Graaf DC, Evans JD. Characterization of two species of Trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. J Eukaryot Microbiol. 2015;62(5):567-583.
- Scott-Dupree C, Ball BV, Welsh O, Allen M. An investigation into the potential transmission of viruses by the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi* R.) to honey bees. Canadian Honey Council Research Symposium Proceedings; 1995;15-24.
- Sepúlveda Gil JA. Apicultura. 1ª ed. Barcelona (España): Aedos; 1980.
- Shen MQ, Cui LW, Ostiguy N, Cox-Foster D. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. J Gen Virol. 2005a;86(8):2281–9.
- Shen MQ, Yang XL, Cox-Foster D, Cui LW. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. Virology. 2005b;342(1):141–9.
- Shimanuki H, Herbert EW, Knox DA. High velocity electron beams for bee disease control. Am bee J. 1984;124:865–7.
- Shimanuki H. Bacteria. En: Morse RA, Nowogrodzki R, editors. Honey bee pests, predators, and diseases. 2nd edition. Ithaca: Cornell University Press; 1990. p. 28–47.
- Shimanuki H. Bacteria, Chapter 3. En: Morse RA, Flottum K, editors. Honey bee pests, predators, and diseases. 3rd ed. Medina, Ohio (EEUU): Al Root Company; 1997. p. 35–54.
- Shutler D, Head K, Burgher-MacLellan KL, Colwell MJ, Levitt AL, Ostiguy N, y col. Honey bee *Apis mellifera* parasites in the absence of *Nosema ceranae* fungi and *Varroa destructor* mites. PLoS One. 2014;9(6):e98599.
- Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Minsart L-A, Mouret C, Hautier L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. PLoS One. 2014;9(7):e103073.
- Skinner AJ. Impacts of tracheal mites (*Acarapis woodi* (Rennle)) on the respiration and

- thermoregulation of overwintering honey bees in a temperate climate. Ontario (Canadá): University of Guelph; 2000.
- Smith DR, Palopoli MF, Taylor BR, Garnery L, Cornuet JM, Solignac M, y col. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). J Hered. 1991;82(2):96–100.
- Sood S, Steinmetz H, Beims H, Mohr KI, Stadler M, Djukic M, y col. Paenilarvins: Iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. Chem Bio Chem. 2014;15(13):1947–55.
- Spiewok S, Neumann P. Infestation of commercial bumblebee (*Bombus impatiens*) field colonies by small hive beetles (*Aethina tumida*). Ecol Entomol. 2006;31(6):623–8.
- Spivak M, Gilliam M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. J Apic Res. 1993;32(3-4):147–57.
- Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. Apidologie. 1998;29(3):291–302.
- Spivak M, Reuter GS. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behaviour. J Econ Entomol. 2001;94(2):326–31.
- Spreafico M, Eördegh FR, Bernardinelli I, Colombo M. First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory test and field trials. Apidologie. 2001;32(1):49–55.
- Steinkraus KH, Morse RA. Media for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. Acta Biotechnologica. 1996;16(1):57–64.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, y col. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. Apidologie. 2011;42(1):49–58.
- Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, y col. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. Apidologie. 2013;44(5):522–36.
- Stewart SD, Lorenz GM, Catchot AL, Gore J, Cook D, Skinner J, y col. Potential exposure of pollinators to neonicotinoid insecticides from the use of insecticide seed treatments in the mid-southern United States. Environ Sci Technol. 2014;48(16):9762–9.
- Strachecka A, Borsuk G, Olszewski K, Paleolog J. A new detection method for a newly revealed mechanism of pyrethroid resistance development in *Varroa destructor*. Parasitol Res. 2015;114(11):3999–4004.

- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ Toxicol Chem*. 2000;19(7):1901–5.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem*. 2001;20(11):2482–6.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci*. 2004;60(3):291–6.
- Sumpter DJT, Martin SJ. The dynamics of virus epidemics in Varroa-infested honey bee colonies. *J Anim Ecol*. 2004;73(1):51–63.
- Schwarz RS, Evans JD. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev Comp Immunol*. 2013;40(3-4):300–10.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011; 28(10):2731–9.
- Tanada Y, Kaya HK. *Insect pathology*. 1st ed. San Diego (California, EEUU): Academic Press; 1993.
- Tang Y, Frewert S, Harmrolfs K, Herrmann J, Karmann L, Kazmaier U, y col. Heterologous expression of an orphan NRPS gene cluster from *Paenibacillus larvae* in *Escherichia coli* revealed production of sevadicin. *J Biotechnol*. 2015;194:112–4.
- Tapasztai Z, Forgách P, Kövágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet Hung*. 2009;57(3):383–8.
- Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis J, Evans JD. Virus infections in Brazilian honey bees. *J Invertebr Pathol*. 2008;99(1):117–9.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, y col. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(12):7185–91.
- Tentcheva D, Gauthier L, Jouve S, Canabady-Rochelle L, Dainat B, Cousserans F, y col. Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*. 2004;35(4):431–9.
- Tentcheva D, Gauthier L, Bagny L, Fievet J, Dainat B, Cousserans F, y col. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*. 2006;37(1):41–50.

- Terio V, Martella V, Camero M, Decaro N, Testini G, Bonerba E, y col. Detection of a honeybee iflavivirus with intermediate characteristics between kakugo virus and deformed wing virus. *New Microbiol.* 2008;31(4):439–44.
- Theantana T, Chantawannakul P. Protease and β -N acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *J Apic Res.* 2008;47(1):68–76.
- Thompson HM. Risk assessment for honey bees and pesticides-recent developments and “new issues.” *Pest Manag Sci.* 2010;66(11):1157–62.
- Thompson HM. Interaction between pesticides and other factors in effects on bees [Internet]. York (UK): Food and Environment Research Agency, Supporting Publications; 2012 [citado 15 Oct 2015] Disponible en: <http://fera.co.uk/ccss/documents/efsaiInteractionOfFactorsInBees.pdf>
- Titera D, Haklova M. Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta.* 2003;38:131–3.
- Todd JH, De Miranda JR, Ball BV. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie.* 2007;38(4):354–67.
- Tomaszewska B. Alterations in the levels of some components of haemolymph in honeybees infected with *Nosema apis* Z. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe.* 1979;23:181–207.
- Tomkies V, Flint J, Johnson G, Waite R, Wilkins S, Danks C, y col. Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie.* 2009;40(1):63–72.
- Topolska G, Gajda A, Pohorecka K, Bober A, Kasprzak S, Skubida M, y col. Winter colony losses in Poland. *J Apic Res.* 2010;49(1):126–8.
- Torto B, Fombong AT, Arbogast RT, Teal PEA. Monitoring *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) with baited bottom board traps: Occurrence and seasonal abundance in honey bee colonies in Kenya. *Environ Entomol.* 2010;39(6):1731–6.
- Toumanoff C. Lea Maladies des Abeilles. *Revue Française de Apiculture.* 1951;68:325.
- Tozkar CÖ, Kence M, Kence A, Huang Q, Evans JD. Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies. *Front Genet.* 2015;6:100.
- Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Spreafico M, Vighi M. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. *Ecotoxicology.* 2004;13(6):589–601.

- Trouiller J, Millani N. Stimulation of *Varroa jacobsoni* Oud. oviposition with semiochemicals from honeybee brood. *Apidologie*. 1999;30(1):3–12.
- Trouiller J, Arnold G, Chappe B, Le Conte Y, Billion A, Masson C. The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie*. 1994;25(3):314–21.
- Truper HG, Dé Clari L. Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as sustantives (nouns) in apposition. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48(2):615.
- Tsigouri AD, Menkissoglu-Spirodi U, Thrasyvoulou A, Diamantidis G. Fluvalinate residues in honey and bees wax after different colony treatments. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2004;72(5):975–82.
- Udagawa S, Horie Y. Notes on some Japanese Ascomycetes. XII. *Trans Mycol Soc Jpn*. 1974;15(2):105–12.
- Underwood RM, Currie R. W. Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and nosema disease (*Nosema* sp.). *J Econ Entomol*. 2009;102(5):1729–36.
- Valera F, Martín-Hernández R, Higes M. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environ Microbiol Rep*. 2011;3(1):47–53.
- Van der Zee R, Pisa L, Andonov S, Brodschneider R, Charrière J-D, Chlebo R, y col. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *J Apic Res*. 2012;51(1):100–14.
- VanEngelsdorp D, Otis GW. The role of cuticular compounds in the resistance of honey bees (*Apis mellifera*) to tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Exp Appl Acarol*. 2001a;25(7):593–603.
- VanEngelsdorp D, Otis GW. Field evaluation of nine families of honey bees for resistance to tracheal mites. *Can Entomol*. 2001b;133(6):793–803.
- VanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):S80–95.
- VanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One*. 2008;3(12):e4071.
- VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, y col. Colony Collapse Disorder: A descriptive study. *PLoS One*. 2009;4(8):e6481.

- VanEngelsdorp D, Hayes Jr. J, Underwood RM, Caron D, Pettis J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J Apic Res.* 2011;50(1):1–10.
- Van Haga A, Keddie BA, Pernal SF. Evaluation of lysozyme-HCl for the treatment of chalkbrood disease in honey bee colonies. *J Econ Entomol.* 2012;105(6):1878–89.
- Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol.* 1994;5:25–40.
- Vidau C, Panek J, Texier C, Biron DG, Belzunces LP, Le Gall M, y col. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol.* 2014;121:89–96.
- Villa JD. Autogrooming and bee age influence migration of tracheal mites to Russian and susceptible worker honey bees (*Apis mellifera* L). *J Apic Res.* 2006;45(2):28–31.
- Villa JD, Danka RG. Caste, sex and strain of honey bees (*Apis mellifera*) affect infestation with tracheal mites (*Acarapis woodi*)*. *Exp Appl Acarol.* 2005;37(3-4):157–64.
- Villa JD, Rinderer TE. Inheritance of resistance to *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in crosses between selected resistant Russian and selected susceptible U.S. honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 2008;101(6):1756–9.
- Villa S, Vighi M, Finizio A, Serini GB. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology.* 2000;9(4):287–97.
- Villa JD, Bustamante DM, Dunkley JP, Escobar LA. Changes in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. *Ann Entomol Soc Am.* 2008;101(5):867–71.
- Villa JD, Bourgeois AL, Danka RG. Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie.* 2013;44(5):511–8.
- Vita Europe. EFB Diagnostic Test Kit [Internet]. Vita®; 2015 [citado 21 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.vita-europe.com/es/productos/efb-diagnostic-test-kit-kit-de-prueba-de-diagnostico-para-efb/>
- Vojvodic S, Jensen AB, James RR, Boomsma JJ, Eilenberg J. Temperature dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood. *Vet Microbiol.* 2011a;149(1-2):200–5.
- Vojvodic S, Jensen AB, Markussen B, Eilenberg J, Boomsma JJ. Genetic variation in virulence among Chalkbrood strains infecting honeybees. *PLoS One.* 2011b;6(9):

e25035.

Vojvodic S, Boomsma JJ, Eilenberg J, Jensen AB. Virulence of mixed fungal infections in honey bee brood. *Front Zool.* 2012;9(1):5.

Von der Ohe W. Control of American foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta.* 2003;38:137–9.

Voorhies EC, Todd FE, Galbraith JK. Economic aspects of the bee industry. Berkeley (California): University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, bulletin 555; 1933.

Waite R, Jackson S, Thompson H. Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(1):20–4.

Wallace F. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp Parasitol.* 1966;18(1):124–93.

Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, y col. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Genet.* 2014;46(10):1081–8.

Waller GD, Erickson BJ, Harvey J, Martin JH. Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. *J Econ Entomol.* 1984;77(1):70–4.

Wallner K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie.* 1999;30(2-3):235–48.

Ward L, Brown M, Neumann P, Wilkins S, Pettis J, Boonham N. A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie.* 2007;38(3):272–80.

Warrit N, Smith DR, Lekprayoon C. Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand. *Apidologie.* 2006;37(1):19–30.

Webster TC. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am Bee J.* 1993;133:869–70.

Webster TC. Fumagillin effects on *Nosema apis* and honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* 1994;87(3):601–4.

Webster TC, Delaplane KS. Mites of the honey bee. Illinois (USA): Dadant and Sons; 2001.

Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.*

1995;8(1):113–30.

Weiss LM, Vossbrinck CR. Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Adv Parasitol.* 1998;40:351–95.

White GF. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. Washington (EEUU): United States Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Technical Series n° 14; 1906.

White GF. Sacbrood, a disease of bees. Washington (EEUU): United States Department of Agriculture, Bureau of Entomology, circular n° 169; 1913.

Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, y col. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science.* 2006;314(5799):642–5.

Wilde J, Fuchs S, Bratkowski J, Siuda M. Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies. *J Apic Res.* 2005;44(4):190–4.

Wilkins S, Brown MA, Cuthbertson AG. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Manag Sci.* 2007;63(11):1062–8.

Wilson MB, Brinkman D, Spivak M, Gardner G, Cohen JD. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US propolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *J Invertebr Pathol.* 2015;124:44–50.

Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu Rev Entomol.* 2009;54(1):405–23.

Wilson WT. Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *J Invertebr Pathol.* 1971;17(2):247–55.

Wilson WT, Nunamaker RA. The incidence of *Nosema apis* in honeybees in Mexico. *Bee World.* 1983;64(3):132–6.

Wolf S, McMahon DP, Lim KS, Pull CD, Clark SJ, Paxton RJ, y col. So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PLoS One.* 2014;9(8):e103989.

Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Takamatsu D, Kobayashi M, Taylor D, y col. Characterization of bifidobacteria in the digestive tract of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. *J Invertebr Pathol.* 2013;112(1):88–93.

Wu M, Sugimura Y, Iwata K, Takaya N, Takamatsu D, Kobayashi M, y col. Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against

- Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. J Insect Sci. 2014;14:129.
- Wu XY, Chin J, Ghalayini A, Hornitzky MAZ. Pulsed-field gel electrophoresis typing and oxytetracycline sensitivity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isolates of Australian origin and those recovered from honey imported from Argentina. J Apic Res. 2005;44(2):87–92.
- Wynns AA, Jensen AB, Eilenberg J. *Ascosphaera callicarpa*, a new species of bee-loving fungus, with a key to the genus for Europe. PLoS One. 2013;8(9):e73419.
- Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. Ecol Evol. 2013;3(2):298–311.
- Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosupresion and viral amplification. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(21):7470–5.
- Yang X, Cox-Foster DL. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. Parasitology. 2007;134(3):405–12.
- Yáñez KP, Bernal JL, Nozal MJ, Martín MT, Bernal J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. J Chromatogr A. 2013;1285:110–7.
- Yáñez KP, Martín MT, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. Trace analysis of seven neonicotinoid insecticides in bee pollen by solid–liquid extraction and liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. Food Anal Methods. 2014;7(2):490–9.
- Yoshiyama M, Kimura K. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. J Invertebr Pathol. 2011;106(2):263–7.
- Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. J Invertebr Pathol. 2013;112(1):62–7.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). J Gen Virol. 2005;86(12):3419–24.
- Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones. J Invertebr Pathol. 2006;92(2):105–8.

- Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). Environ Microbiol. 2008;10(6):1612–20.
- Zaluski R, Kadri SM, Alonso DP, Martins Ribolla PE, De Oliveira Orsi R. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. Environ Toxicol Chem. 2015;34(5):1062-9.
- Zheng H-Q, Gong H-R, Huang S-K, Sohr A, Hu F-L, Chen YP. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. Vet Microbiol. 2015;177(1-2):1-6.
- Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. Replication of *Varroa destructor* virus 1 (VDV-1) and a *Varroa destructor* virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. Virology. 2011;417(1):106–12.

ANEXO I

Encuesta 2010





Consejería de Agricultura y Desarrollo Rural
Delegación Provincial
Avda. del Ejército, 10 - 19004 GUADALAJARA

ENCUESTA

FECHA DE RECOGIDA DE LA MUESTRA

Nombre y apellidos

Teléfono

Municipio

Provincia

Asociación

Nº total de colmenas

Nº de asentamientos

Tipo colmenas

Layens

Perfección

Nº de colmenas del asentamiento muestreado

Trashumancia SI ☐ NO ☐ Indique las provincias

¿Cuántas colmenas productivas tenía el 1-octubre-2009?

¿Cuántas colmenas productivas tenía el 1-abril-2010?

¿Cuántas colmenas o núcleos ha comprado o realizado entre 1-octubre-09 y 1-abril-10?

¿Cuántas colmenas o núcleos ha vendido o eliminado en ese período?

¿Cuántas de sus colonias que murieron entre 1-octubre y el 1-abril lo hicieron sin abejas muertas en las colmenas o en el colmenar?

Nº de tratamientos para VARROA realizados en el último año 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐

Primer tratamiento

Fecha inicio

Producto

Apistan

Bayvarol

Apivar

Checkmite+

Otro

Nº tiras por colmena

1

2

3

4

Semanas con tratamiento

4

6

8

10

Segundo tratamiento

Fecha inicio

Producto

Apistan

Bayvarol

Apivar

Checkmite+

Otro

Nº tiras por colmena

1

2

3

4

Semanas con tratamiento

4

6

8

10

A realizado
tratamientos
frente a :

Nosema

SI ☐

NO ☐

Loque

SI ☐

NO ☐

Ascosporesis

SI ☐

NO ☐

Producto

Producto

Producto

En este proyecto se pretende establecer un sistema de vigilancia de las enfermedades apícolas. Todos los datos obtenidos serán tratados con la máxima confidencialidad que marca la ley y se utilizarán exclusivamente con fines de investigación. Los resultados se facilitarán a los organismos participantes para que puedan ponerlos en conocimiento de los apicultores. Este muestreo no perjudicará las colmenas que participen en el estudio, ya que tan solo necesitamos que nos realicen una toma de muestras sin interferir lo más mínimo en su manejo habitual.

Necesitamos que la selección de las colmenas para el muestreo se realice al azar incluyendo colmenas sanas y enfermas. Esto es muy importante para garantizar que los resultados que obtengamos sean correctos. Para agradecer su colaboración, si el apicultor tiene un interés especial en alguna colmena en particular nos ofrecemos a realizarles en nuestro laboratorio los diagnósticos gratuitos de aquellas colmenas que no entren en el estudio, para ello remítanos la muestra de forma independiente en las cajas sueltas que les enviamos para estos casos. De esta manera las muestras se procesarán más rápidamente y los resultados los tendrán antes.

Para cualquier duda o consulta contacten con nosotros en el teléfono 949.25.00.26 (preguntar por Almudena, Raquel o Mariano).

INSTRUCCIONES IMPORTANTES PARA TOMA DE MUESTRAS:

Con el fin de que el muestreo nacional sea homogéneo y así poder analizar los resultados correctamente, hemos establecido una serie de pautas para la toma de muestras:

1. Rellenar la Encuesta.
2. Elegir al azar seis colmenas del colmenar.
3. Barrer una pequeña cantidad de abejas adultas en cada una de las 6 Cajas de cartón identificadas con ABEJAS.
4. Introducir una pequeña porción de cuadro de cría en cada una de las 6 Cajas de cartón identificadas con CRÍA.
5. Recoger una pequeña cantidad de los restos de los fondos de las seis colmenas del estudio e introducirlos juntos en el Bote identificado con FONDO DE COLMENA.
6. Tomar una pequeña cantidad de miel de reservas de una colmena del muestreo en el Bote identificado con MIEL.
7. Tomar una pequeña porción de cuadro con polen de una de las colmenas muestreadas e introducirlo en el Bote identificado con POLEN.
8. Introducir todas las muestras junto con la encuesta en la bolsa blanca
9. Llevar las muestras a la asociación o Delegación de Agricultura participante

Enviar las muestras a Centro Apícola Regional, Laboratorio de Patología, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo.

Muchas gracias por su colaboración

ANEXO II

Encuesta 2011



FECHA DE RECOGIDA DE LA MUESTRA					
Nombre y apellidos					
Teléfono			Municipio		
Provincia			<u>Asociación</u>		
Nº total de colmenas				Nº de asentamientos	
Tipo colmenas	Layens	Perfección			
Nº de colmenas del asentamiento muestreado					
Trashumancia		SI	NO	Indique las provincias	
Cálculo de pérdidas INVERNADA 10-11 (entre 1-October-2010 y 1-Abril- 2011)					
¿Cuántas colmenas productivas tenía el 1-October-2010 ?					
<i>En el siguiente grupo de cuestiones se le pregunta por el número de colonias que ha perdido. Considere como una colmena perdida si está muerta, reducida a unos cientos de abejas o aunque está viva ha perdido la reina o está zanganera).</i>					
¿Cuántas de sus colmenas productivas se perdieron entre el 1-October-2010 y el 1-Abril-2011 ?					
De ellas ¿Cuántas estaban sin abejas muertas en el interior de la colmena o en el colmenar?					
¿Y Cuántas se perdieron por no tener reina o zanganeras?					
Responda las siguientes preguntas SOLO si compró, vendió, juntó o dividió colmenas <u>entre</u> 1-October-2010 y 1-Abril-2011					
<u>Entre el 1-October-2010 y 1-Abril-2011</u>					
¿Cuántas colonias compró o dividió para usarlas como colmenas de producción?					
¿Cuántas colmenas vendió o regaló?					
¿Cuál fue la reducción total en colmenas productivas por unir o juntar colonias?*					
<i>*Ej. Dos colmenas que se juntaron = pérdida de una colmena</i>					
¿Cuántas colmenas productivas tenía el 1-Abril-2011 ?					
Cálculo de Pérdidas Temporada 2010 (entre el 1-Abril-2010 y el 1-October-2010)					
¿Cuántas colmenas productivas tenía a 1-Abril-2010					
Responda las siguientes preguntas SOLO si compró, vendió, juntó o dividió colmenas entre 1-Abril-2010 y 1-October-2010					
<u>Entre 1-Abril-2010 y 1-October-2010</u>					
¿Cuántas colmenas productivas compró o dividió?					
¿Cuántas colmenas vendió o regaló?					
¿Cuál fue la reducción total en colmenas productivas por unir o juntar colonias?*					
<i>*ej. Dos colmenas que se juntaron = pérdida de una colmena</i>					
¿Cuántas de las colonias que ya tenía (1-4-10) o de las nuevas se perdieron en ese periodo?					
TRATAMIENTOS					
Nº Tratamientos de Varroa realizados en el último año_		1	2	3	
<u>Primer tratamiento</u>		Fecha inicio			
Producto	Apistan	Bayvarol	Apivar	Checkmite+	Otro
Nº tiras por colmena	1	2	3	4	
Semanas con tratamiento	4	6	8	10	
<u>Segundo tratamiento</u>		Fecha inicio			
Producto	Apistan	Bayvarol	Apivar	Checkmite+	Otro
Nº tiras por colmena	1	2	3	4	
Semanas con tratamiento	4	6	8	10	
Ha realizado tratamientos frente a :	Nosema	SI	NO	Producto	
	Loque	SI	NO	Producto	
	Ascosferosis	SI	NO	Producto	

En este proyecto se pretende establecer un sistema de vigilancia de las enfermedades apícolas. Todos los datos obtenidos serán tratados con la máxima confidencialidad que marca la ley y se utilizarán exclusivamente con fines de investigación. Los resultados se facilitarán a los organismos participantes para que puedan ponerlos en conocimiento de los apicultores. Este muestreo no perjudicará las colmenas que participen en el estudio, ya que tan solo necesitamos que nos realicen una toma de muestras sin interferir lo más mínimo en su manejo habitual.

Necesitamos que la selección de las colmenas para el muestreo se realice al azar incluyendo colmenas sanas y enfermas. Esto es muy importante para garantizar que los resultados que obtengamos sean correctos. Para agradecer su colaboración, si el apicultor tiene un interés especial en alguna colmena en particular nos ofrecemos a realizarles en nuestro laboratorio los diagnósticos gratuitos de aquellas colmenas que no entren en el estudio, para ello remítanos la muestra de forma independiente en las cajas sueltas que les enviamos para estos casos. De esta manera las muestras se procesarán más rápidamente y los resultados los tendrán antes.

Para cualquier duda o consulta contacten con nosotros en el teléfono 949.25.00.26 (preguntar por Almudena, Raquel o Mariano).

INSTRUCCIONES IMPORTANTES PARA TOMA DE MUESTRAS:

Con el fin de que el muestreo nacional sea homogéneo y así poder analizar los resultados correctamente, hemos establecido una serie de pautas para la toma de muestras:

1. Rellenar la Encuesta.
2. Elegir al azar seis colmenas del colmenar.
3. Barrer una pequeña cantidad de abejas adultas en cada una de las 6 Cajas de cartón identificada con ABEJAS.
4. Introducir una pequeña porción de cuadro de cría en cada una de las 6 Cajas de cartón identificada con CRÍA.
5. Recoger una pequeña cantidad de los restos de los fondos de las seis colmenas del estudio e introducirlos juntos en el Bote identificado con FONDO DE COLMENA.
6. Tomar una pequeña cantidad de miel de reservas de una colmena del muestreo en el Bote identificado con MIEL.
7. Tomar una pequeña porción de cuadro con polen de una de las colmenas muestreadas e introducirlo en el Bote identificado con POLEN.
8. Introducir todas las muestras junto con la encuesta en la bolsa blanca
9. Llevar las muestras a la asociación o Delegación de Agricultura participante

Enviar las muestras a Centro Apícola Regional, Laboratorio de Patología, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo.

Muchas gracias por su colaboración

ANEXO III

Cepero y col., 2014a



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study

Almudena Cepero¹, Jorgen Ravoet², Tamara Gómez-Moracho^{1,3,4}, José Luis Bernal⁵, Maria J Del Nozal⁵, Carolina Bartolomé^{3,4,6}, Xulio Maside^{3,4,6}, Aránzazu Meana⁷, Amelia V González-Porto⁸, Dirk C de Graaf², Raquel Martín-Hernández^{1,9} and Mariano Higes^{1*}

Abstract

Background: Here we present a holistic screening of collapsing colonies from three professional apiaries in Spain. Colonies with typical honey bee depopulation symptoms were selected for multiple possible factors to reveal the causes of collapse.

Results: Omnipresent were *Nosema ceranae* and Lake Sinai Virus. Moderate prevalences were found for Black Queen Cell Virus and trypanosomatids, whereas Deformed Wing Virus, Aphid Lethal Paralysis Virus strain Brookings and neogregarines were rarely detected. Other viruses, *Nosema apis*, *Acarapis woodi* and *Varroa destructor* were not detected. Palinologic study of pollen demonstrated that all colonies were foraging on wild vegetation. Consequently, the pesticide residue analysis was negative for neonicotinoids. The genetic analysis of trypanosomatids GAPDH gene, showed that there is a large genetic distance between *Crithidia mellificae* ATCC30254, an authenticated cell strain since 1974, and the rest of the presumed *C. mellificae* sequences obtained in our study or published. This means that the latter group corresponds to a highly differentiated taxon that should be renamed accordingly.

Conclusion: The results of this study demonstrate that the drivers of colony collapse may differ between geographic regions with different environmental conditions, or with different beekeeping and agricultural practices. The role of other pathogens in colony collapse has to be studied in future, especially trypanosomatids and neogregarines. Beside their pathological effect on honey bees, classification and taxonomy of these protozoan parasites should also be clarified.

Keywords: Honeybee, Colony collapse, Viruses, Parasites, Neonicotinoids, Palinology

Background

The beekeeping sector is suffering unexpected losses in many countries to such extent that pollination services in some cases are jeopardized. Several explanatory 'drivers' are known: an increasing number of pathogens, invasive species, exposure to pesticides, reduced genetic diversity and some apicultural practices. The driver 'pathogens' has received much attention, so scientists have sought for years to find the dangerous mixture of transmittable bee diseases. They often had to face conflicting data and it became increasingly clear that the involved pathogens may vary significantly in different regions.

The early detection of Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) [1], Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) [2] and Deformed Wing Virus (DWV) [3] in collapsing colonies has determined the experimental design of many subsequent health studies. Later on, the set of target viruses has increased: so, Kashmir Bee Virus (KBV), Black Queen Cell Virus (BQCV) and Sacbrood Virus (SBV) became commonly examined [4]. An unbiased microbiome study aimed at finding the cause of the Colony Collapse Disorder (CCD) in the USA has extended this 'short list' with the Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) and the microsporidian parasite *Nosema ceranae* [5]. Further investigations either indicate [6,7] or confirmed [8-11] the important role of *N. ceranae* in temperate areas of the world. Very recently, the trypanosomatid *Crithidia mellificae* was found to be a contributory factor to the colony losses in Belgium [12].

* Correspondence: mhiges@jccm.es

¹Bee Pathology Laboratory, Consejería de Agricultura, Gobierno de Castilla-La Mancha, Centro Apícola Regional (CAR), Marchamalo E-19180, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

The driver 'invasive species' refers mainly to the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. With respect to bee mortality, the *Varroa*-load seems to be one of the few decisive factors who stand across the borders. In the USA, the small hive beetle (*Aethina tumida*) seems to be another leading cause of mortality in beekeeping operations [13].

Among proposed causes of bee mortality, the exposure of bees to pesticides received much attention lately and to such extent that the European Commission adopted a proposal [14] to restrict the use of 3 pesticides belonging to the neonicotinoids family (clothianidin, imidacloprid and thiametoxam) for a two years period. However, nationwide monitoring programs of honeybees' exposure level to these crop protection products are rather scarce. Moreover, the real involvement of these pesticides is controversial [15].

Although there is a general agreement that the bee mortality problem is multifactorial [13,16], monitoring programs or case studies that go beyond screening of bee pathogens are rather limited. Besides, the few nationwide studies or clinical studies focusing on pathogens in combination with pesticide residue analysis [17-19] are restricted to the current 'short list' of pathogens (DWV, ABPV, *V. destructor*).

Here we present a holistic screening (a case study) of collapsing honey bee colonies from three professional Spanish apiaries with high colony losses. Colonies with typical depopulation were analysed for the presence of multiple putative drivers of collapse: honey bee viruses, *Nosema* spp. *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, trypanosomatids, neogregarines, neonicotinoid insecticides and foraging flora. This study could also reveal what causal factors should be included in future Spanish monitoring programs [20-28].

Results and discussion

The most widespread pathogens detected in the analyzed samples were *N. ceranae* and Lake Sinai Virus (LSV), found in all samples (100%, 10/10). Viruses of the ABPV complex, *Acarapis woodi*, *Nosema apis*, CBPV, SBV, SBPV and *Varroa destructor* were not detected (0%, 0/10) (Table 1).

The high prevalence (100%) of *N. ceranae* in the present study confirmed earlier reports [25,29]. Its ability to evoke the collapse of honey bee colonies and to create the symptoms described by veterinarians (see methods), have been previously reported [10,18,20,30-34]. *N. ceranae* plays a controversial role in the worldwide colony losses phenomenon [16]. While in Mediterranean areas a direct link between this pathogen and the honeybee losses has been reported [6,8,9,11,30,35,36], it can be excluded as main cause of losses in colder areas or continental climates [17,37-39]. Nevertheless, in Belgium it was found that the adverse effects of this microsporidian can

be enhanced in combination with the trypanosomatid *C. mellifica* [12]. In the present study, they were found in 4 samples and 2 apiaries. The three isolates studied (324, 325 and 1980) displayed several haplotypes, with variable levels of intra-isolate diversity (Table 2). Overall, *18S rDNA* was less variable (pooled total diversity $\pi = 0.16 \pm 0.06\%$; average \pm SE) than *GAPDH* ($\pi = 0.40 \pm 0.14\%$) although the difference between both loci was not statistically significant. *C. mellifica* ATCC30254 also presented multiple haplotypes at the *GAPDH* locus, which reflects that this reference strain is not isogenic.

The pairwise comparison of the *18S rDNA* sequences revealed that *C. mellifica* ATCC30254 (KJ704242 – KJ704251) exhibited a single mutation that was not present either in the presumed *C. mellifica* sequences deposited in GenBank (KF607064.1 and AB745488.1) or in ours (KJ704218 – KJ707241). This single difference between *C. mellifica* ATCC30254 and the rest of the sequences is extremely important since any nucleotide variant in a highly conserved marker like the *18S rDNA* gene, which displays strong identity (about 99%) among different genus (Cepero et al., submitted), suggests that *C. mellifica* ATCC30254 and our sequences (which are mostly identical to KF607064.1 and AB745488.1; Additional file 1: Table S1) might represent genetically isolated organisms.

The analysis of the genetic distances between *GAPDH* sequences showed that *C. mellifica* ATCC30254 (KJ704273 – KJ704282) displayed a $6.89 \pm 1.32\%$ divergence with respect to the rest of the sequences, that included both the presumed *C. mellifica* sequences deposited in GenBank (AB716357.1, AB745489.1 and JF423199.1) and ours (KJ704252 – KJ704272), which, again, were in a large fraction identical to AB716357.1 and AB745489.1 (Additional file 2: Table S2). However, this finding is even more surprising if we bear in mind that total divergence estimates, as those calculated here, underestimate the neutral genetic distance between sequences (as replacement sites account for nearly 75% of the coding sequence and their evolutionary rate is severely limited by purifying selection). Consequently, to obtain more reliable estimates of divergence we performed pairwise comparisons at synonymous sites, which are considered neutral or nearly neutral. The outcome of this analysis is that there is a large genetic distance ($23.47 \pm 5.48\%$, Table 3) between *C. mellifica* ATCC30254, an authenticated cell strain since 1974, and the rest of the presumed *C. mellifica* sequences. This means that the latter group corresponds to a highly differentiated taxon that should be renamed accordingly. It is also worth noting the dispersal of *Crithidia* sp. sequences all over the tree (Figure 1), which questions their current taxonomic classification. In line with this, highly divergent *C. mellifica* lineages were previously mentioned [40].

Table 1 Results of the honey bee pathogen (viruses, parasites) screening and pollen analyses (pesticide residue; palynology) on samples from collapsing colonies in Spain

Sample information			Viruses				Parasites					
Sample ID	Apiary	Location	BQCV	DWV	LSV	ALPV	<i>V. destructor</i>	<i>A. woodi</i>	<i>Trypanosomatids</i>	<i>Neogregarines</i>	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>
55	1	Guadalajara	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
56	1	Guadalajara	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
57	1	Guadalajara	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
58	1	Guadalajara	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
59	1	Guadalajara	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1980	2	Vizcaya	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
324	3	Murcia	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
325	3	Murcia	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1
328	3	Murcia	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
329	3	Murcia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Sample information			Pesticide							Palinology	
Sample ID	Apiary	Location	Dinotefuran	Nitenpyram	Thiametoxan	Clothianidin	Imidacloprid	Acetamiprid	Thiacloprid	Plant genus	Source
55	1	Guadalajara	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Raphanus, Rosmarinus, Salix, Brassica, Dorycnium</i>	Wild spp.
56	1	Guadalajara	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Raphanus, Rosmarinus, Salix, Brassica, Dorycnium</i>	Wild spp.
57	1	Guadalajara	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Raphanus, Rosmarinus, Salix, Brassica, Dorycnium</i>	Wild spp.
58	1	Guadalajara	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Raphanus, Rosmarinus, Salix, Brassica, Dorycnium</i>	Wild spp.
59	1	Guadalajara	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Raphanus, Rosmarinus, Salix, Brassica, Dorycnium</i>	Wild spp.
1980	2	Vizcaya	0	0	0	0	0	0	0	<i>Helianthemum, Raphanus, Rosmarinus</i>	Wild spp.
324	3	Murcia	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Cistus, Salix, Lavandula</i>	Wild spp.
325	3	Murcia	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Cistus, Salix, Lavandula</i>	Wild spp.
328	3	Murcia	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Cistus, Salix, Lavandula</i>	Wild spp.
329	3	Murcia	0	0	0	0	0	0	0	<i>Thymus, Cistus, Salix, Lavandula</i>	Wild spp.

0 = not detected; 1 = detected.

Table 2 Estimates of Trypanosomatid diversity at all sites (π) expressed as percentage

Isolate	18S rDNA		GAPDH	
	Average π	SE	Average π	SE
ATCC30254	0.00	0.00	0.68	0.23
324	0.06	0.06	0.86	0.35
325	0.30	0.11	0.29	0.11
1980	0.08	0.08	0.39	0.16
Pooled	0.16	0.06	0.40	0.14

SE standard error, calculated by a bootstrap procedure (3000 replicates) with MEGA5.

An unbiased metagenomic study in a Spanish non-professional apiary with collapsing colonies revealed the presence of several viruses, among which LSV complex and ALPV strain Brookings [41]. In this study, the former was present in all samples, and the latter in only a few (20%, 2/10). Sequencing of the LSV amplicons revealed that the strains from apiary 1 and 2 were almost identical (Genbank: KJ561228, KJ561229), but had a low resemblance to the strain from apiary 3 (Genbank: KJ561227). This strain has a high amino acid similarity (89%) with the Orf1 of LSV strain Navarra (Genbank: AGF84788). So, different LSV strains are present in Spain similar to the situation in Belgium [12] and the USA [40,42]. The pathogenic implications of LSV in honey bee health status are under discussion. Cornman et al. [40] suggested a potential association between LSV and CCD colonies, although this observation was not found in a Belgian bee health screening [12]. In our work, LSV represents the most abundant virus in the analyzed

samples collected during spring and summer. For these reason, the importance of LSV and the pathogenicity of different LSV strains should be further investigated.

Black Queen Cell Virus (BQCV) was found in 50% of samples (5/10) and in all apiaries. This result corresponds with those obtained before [24]. Aphid Lethal Paralysis Virus (ALPV) strain Brookings was found in 20% of samples (2/10) in two apiaries. The amino acid sequences were identical (>98%) to those detected previously in Belgium [12], Spain [41] and the USA [42] (Genbank: AGU62863, AGF84786, AEH26191). Curiously, Deformed Wing Virus (DWV) was only detected in one sample in one apiary, and this might be related to the low prevalence of *V. destructor* in the analyzed samples and therefore apiaries.

Neogregarines were detected in one sample. Direct sequencing indicated an infection by *Apicystis bombi*. However, the presence of overlapping peaks at particular points of the electropherograms suggested a potential mixture of templates, which was further investigated by cloning and sequencing. This process yielded sequences from another Apicomplexan parasite (99% identity with *Eimeriidae* or *Cryptosporidiidae* in Blastn), which was co-infecting the colony with *A. bombi* (whose presence was only confirmed by direct sequencing). Although *A. bombi* was thought to be mainly a bumblebee parasite [43,44], there are increasing findings of that parasite in honey bees [45-47] since a molecular detection method became available [44]. Nevertheless, the amplification of other parasites with the same primers should be taken into account to avoid misdiagnosis in future studies.

Table 3 Pairwise estimates of synonymous substitutions per synonymous site between GAPDH sequences

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0													
3	0	0												
4	1.58	1.58	1.58											
5	0	0	0	1.58										
6	1.60	1.60	1.60	0	1.60									
7	0	0	0	1.58	0	1.60								
8	1.58	1.58	1.58	0	1.58	0	1.58							
9	0	0	0	1.58	0	1.60	0	1.58						
10	1.60	1.60	1.60	0	1.60	0	1.60	0	1.60					
11	24.66	24.66	24.66	26.77	24.66	26.30	24.66	26.77	24.66	26.30				
12	21.80	21.80	21.80	23.83	21.80	23.36	21.80	23.83	21.80	23.36	3.23			
13	23.21	23.21	23.21	25.29	23.21	24.81	23.21	25.29	23.21	24.81	4.34	1.06		
14	23.21	23.21	23.21	25.29	23.21	24.81	23.21	25.29	23.21	24.81	1.06	2.14	3.23	

1: AB745489.1, 2: AB716357.1, 3: JF423199.1, 4: KJ704252 - 3, 5: KJ704254, 6: KJ704255, 7: KJ704256 - 63, 8: KJ704264, 9: KJ704265 - 69, KJ704271 - 72, 10: KJ704270, 11: KJ704273, KJ704275, 12: KJ704274, KJ704281 - 82, 13: KJ704276 - 77, KJ704279, 14: KJ704278, KJ704280. Analyses were conducted in MEGA5 using the Nei-Gojobori model. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Comparisons involving ATCC30254 and presumed *C. mellificae* sequences are highlighted in bold.



Figure 1 Map of Spain. Provinces of origin of the samples. In the north, Vizcaya. In the central area, Guadalajara. In the southeast, Murcia.

Palinological analyses confirmed that the honeybees foraged on wild plants. As a consequence, no neonicotinoid residues in stored pollen were detected. Although these pesticides exhibited severe acute and sublethal effects on bees [48-50], their role as sole cause of colony loss is still not clear [13,51]. Indeed, most published data have shown that acaricides, herbicides or other insecticide molecules, were more prevalent than neonicotinoids or phenilpirazoles in hives [22,23,52-55]. Our results confirm that neonicotinoids are not the only cause capable of causing the colony collapse of honey bee colonies.

Conclusion

Many predictive markers and drivers have been suggested for honey bee colony collapses [5,13,56,57]. The collapses of honey bee colonies in our study were not related with the presence of neonicotinoids or *V. destructor*. Instead, *N. ceranae* seems to be the main culprit of the colony losses in this study as already suggested in previous investigations [20,30]. The role of other pathogens in colony collapse has to be studied in future, especially trypanosomatids and

neogregarines. Beside their pathological effect on honey bees, classification and taxonomy of these protozoans also should be clarified. The results of this study clearly demonstrate that the drivers of colony collapse may differ between different geographic regions (see 16, 40).

Methods

Samples were collected from three professional apiaries each located in a different region of Spain, all under different climatic and environmental conditions (Figure 2). The veterinarians responsible for these apiaries contacted the Centro Apícola Regional (CAR) pathology laboratory, because of alarming symptoms like depopulation and unusually high colony losses.

Apiaries

Apiary 1: It is located in the Center of Spain in the province of Guadalajara and consisted of 400 bee colonies wintered in 2012, distributed in five apiaries all sited in the same province. In early spring 2013, 70% of the colonies had collapsed, with clear symptoms of depopulation such as disappearance of adult bees and unattended

brood. Chalkbrood and foulbrood were not reported by the responsible veterinarian. The 30% of surviving colonies in early spring had a small adult bee population and low vitality. To perform the analysis, 25 weak surviving bee colonies were sampled (worker bees and pollen) in August 2013.

Apiary 2 2: It is located in the province of Vizcaya, Northern Spain. In winter 2012, it had 300 bee colonies distributed in 3 apiaries very closed each other. In early spring 2013, all colonies showed clear signs of depopulation and imminent risk of collapse. The responsible veterinarian has not reported other disease symptoms, although the bee colonies showed a very marked lack of vitality. For analysis, ten collapsing colonies were sampled (worker bees and pollen) in August 2013.

Apiary 3: It is located in the Southeast of Spain, in the province of Murcia. This apiary wintered 175 bee colonies distributed in 4 apiaries in 2011 and the 90% of them had collapsed in early spring 2012. For the analysis, 16 weak surviving colonies were sampled (worker bees and pollen) in May 2012.

Honey bee sampling

Samples of worker honey bees ($n = 100$ worker bees) and stored pollen, were collected from the brood chamber by the veterinarians in charge and sent to the CAR bee Pathology Laboratory in spring (samples from Vizcaya and Murcia) or early summer (samples from Guadalajara). Samples from the apiary 1 ($n = 25$; five per apiary) were pooled together to obtain five pooled samples of five colonies each, one pool sample per apiary. Samples from apiary 2 ($n = 10$) were pooled into a single sample. Samples for apiary 3 ($n = 16$; four per apiary) were processed as the first apiary so there were four pooled samples from four colonies each (one pooled sample per apiary).

Varroa destructor detection

The presence of *V. destructor* in worker honey bee samples were analyzed as described previously [19,20].

DNA and RNA extraction

All bee samples were macerated in AL buffer 50% (Qiagen) as previously described [24] using sterile bags with filter. Resulting pellets were used for DNA extraction and supernatants for RNA extraction. They were frozen at -80°C until extraction of the nucleic acids.

For DNA extraction, the pellet was resuspended in 3 ml sterile water and 400 μl was transferred into a 96-well plate (Qiagen) with glass beads (2 mm diameter, Sigma). Samples were then processed as previously described [25]. Briefly, the plates were shaken for 6 min at 30 Hz. Afterwards, 150 μL of each sample was transferred to a Deepwell plate (Eppendorf) with 30 μl of ATL buffer (Qiagen) and 20 μl of Proteinase K (Qiagen). After overnight incubation at 56°C ,

DNA was extracted using the BS96 DNA Tissue extraction protocol in a BioSprint machine (Qiagen). Plates were stored at -20°C until use.

RNA was extracted from the supernatant using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions for RNA isolation. Briefly, 200 μl PBS and 1 μl carrier RNA were added to 220 μl of the resulting supernatants. After 10 min incubation at 56°C , 230 μl ethanol was added. Subsequent to binding and washing, RNA elution was accomplished with 50 μl nuclease-free water.

The *C. mellifica* reference strain ATCC30254 was included in the analysis for sequence comparison with field isolates. This strain was first cultivated as recommended in ATCC medium 355. Further sub-cultivation was performed in Brain Heart Infusion (BHI) medium as described by Popp and Lattorf [58]. Visible and isolated colonies were taken and resuspended in milliQ water (PCR-quality) and the processed for DNA extraction as above described.

PCR and MLPA analysis

A broad pathogen screening of the honeybee samples was performed using published PCR assays for *Acarapis* spp. mites [27], *Nosema apis* and *N. ceranae* [25], trypanosomatids and neogregarines [44]. Given that the *18S rDNA* gene alone is unsuitable to classify trypanosomatid/s infecting honeybee colonies (Cepero et al., submitted), these were also amplified at the *GAPDH* locus using CrGD-1 F (5' GGTCGCCGTGGTGGAC 3') and CrGD-1R (5' CGT CGCCGTGTAGGAGTGA 3'). Since these oligos did not produce an amplicon from ATCC30254, this strain was PCR-amplified with Tryp-1 F (5' CCGAGTACTTCKC STACCAG 3') and Tryp-1R (5' AGCCGAGGATGCC CTTTCAT 3'), a set of primers that should amplify most *Crithidia* and *Leptomonas* species published in GenBank to date. As template, we used 5 μl DNA in each reaction.

For virus analysis, the BeeDoctor test, a 'multiplex-ligation probe dependent amplification' (MLPA) based method capable of detecting CBPV, DWV-complex, ABPV-complex, BQCV, SBPV and SBV, was performed as described before [59], starting from 3 μl RNA. The amplified MLPA products were analyzed using 4% high resolution agarose gel electrophoresis.

In addition, we performed additional RT-PCR analyses for few viruses. Using random hexamer primers, 500 ng RNA was retro-transcribed with the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). For ALPV strain Brookings and LSV complex detection, we used 1 μl cDNA template in the PCR test described by Runckel et al., [42] and Ravoet et al. [12] respectively.

Sequencing and cloning

Positive samples of ALPV strain Brookings, LSV complex, trypanosomatids and neogregarines were re-analyzed using

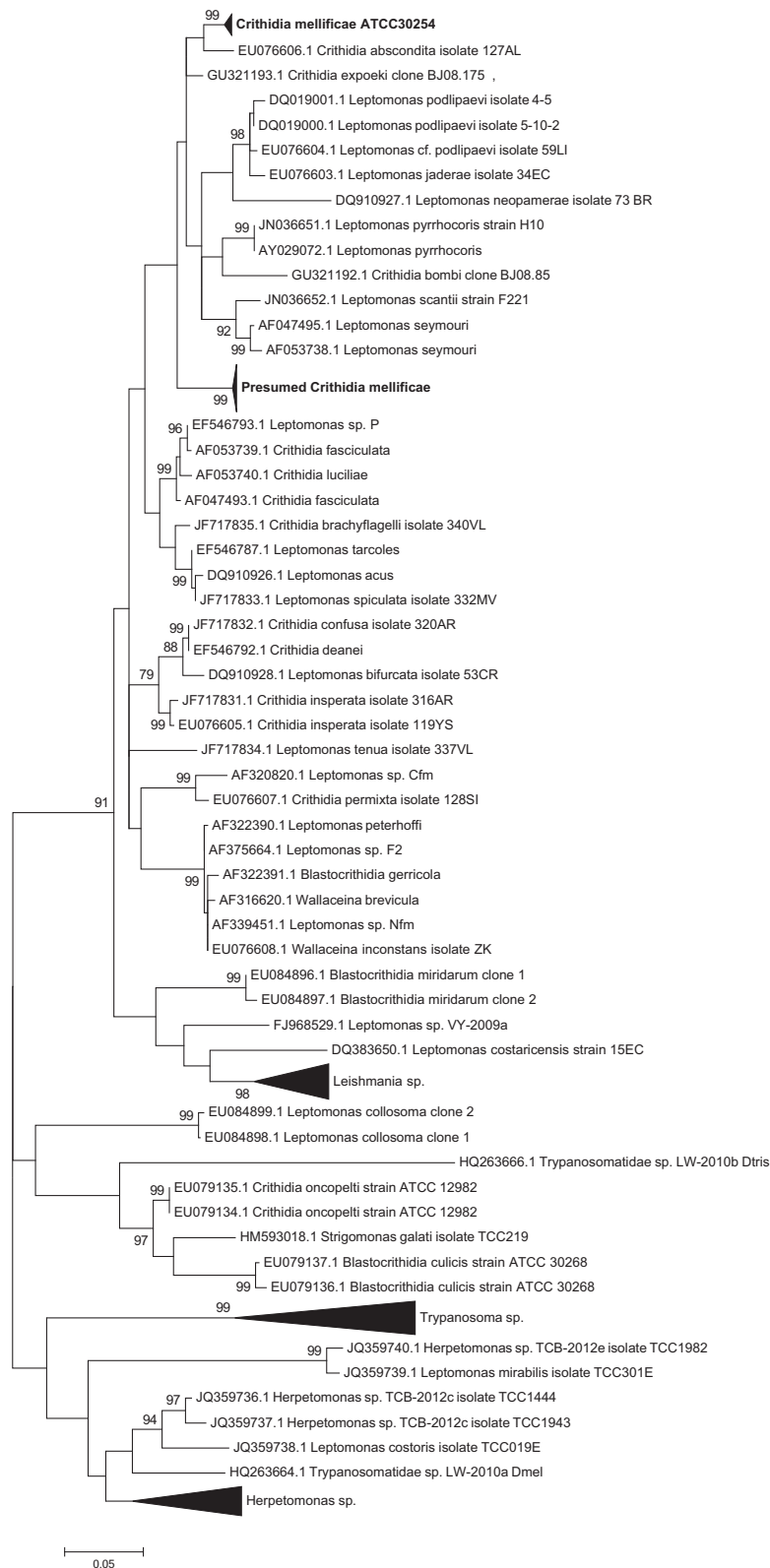


Figure 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 2 Phylogenetic analysis of GAPDH sequences of trypanosomatids. The tree was constructed using the Maximum Likelihood method (based on the General Time Reversible model, assuming a Gamma distribution and allowing some sites to be evolutionarily invariable). Bootstrap values (500 replicates) are shown next to the branches. Codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. The clade of presumed *Crithidia mellificae* sequences, both from GenBank (AB745489.1, AB716357.1, JF423199.1) and from this work (KJ704252- KJ704272), was compressed for ease of visualisation and is displayed in bold. The same was done for *C. mellificae* ATCC30254 sequences (KJ704273 – KJ704282).

the HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen) (viruses) or the Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche Diagnostics) (protozoans).

Protozoan amplicons were cloned using the Topo TA Cloning Kit (Invitrogen) after purification with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Plasmids were purified using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Both strands were sequenced with M13 primers on an automated ABI3730XL sequencer using Big Dye (Applied Biosystems). ALPV strain Brookings and LSV complex amplicons were bidirectional sequenced on an ABI3130XL with gene-specific primers.

Sequences were checked for accurate base calling using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation) and their identity verified by means of a nucleotide BLAST. Alignments were manually edited with BioEdit [60] and submitted to GenBank (KJ704218 – KJ704282).

Estimates of overall and pairwise nucleotide diversity were obtained with MEGA v.5.05 [61]. These were measured as π , applying the Jukes and Cantor (JC) correction [62], and their standard error (SE) calculated by a bootstrap procedure (3000 replicates). This software was also used to construct a maximum likelihood phylogeny under the GTR + G + I model (General Time Reversible + Gamma distributed + Invariable sites) that was selected as best model by applying the Akaike information criterion (AIC), as implemented in MEGA. The reliability of the tree topology was tested by bootstrap support (500 replicates).

Pollen sampling

In order to obtain a representative pollen samples from each colony, stored pollen (3 squares of approximately 10 × 10 cm each) collected from the brood chamber combs were extracted aseptically from five colonies of each apiary [20,22]. Each pollen sample was divided in two aliquots. One aliquot of 100 g was used for neonicotinoid screening, while the other aliquot of 5–10 g was used for palinological analysis. Samples were stored at –20°C until further use.

Neonicotinoids analysis

Seven neonicotinoid insecticides (acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid, and thiamethoxam) were analyzed pollen with a previous methodology developed by Yáñez et al. [63]. It should be mentioned that the equipment, methods and reagents were the same than the described in this previous research. The

sample treatment consisted of a solid–liquid extraction of the neonicotinoids from pollen with dichloromethane, followed by evaporation and reconstitution. Briefly, 2 g pollen sample and 10 mL of dichloromethane were transferred to a centrifuge tube. The mixture was mechanically shaken for 10 min at 800 oscillations per minute in a Vibromatic and then centrifuged for 10 min at 25°C and 10,400 × g. Following this, the supernatant was collected, filtered through paper filter, transferred to a 25-mL conical flask, and then evaporated until dry in a rotary evaporator at 40°C. The dry extract was reconstituted with 1 mL of a water and acetonitrile mixture (50:50, v/v) and the resulting solution was passed through a syringe filter, after which a 15-μL aliquot was injected into a liquid chromatograph (LC) coupled to an electrospray ionization mass spectrometry detector (ESI-MS). Once the neonicotinoids were extracted, they were determined using an optimized LC-ESI-MS method, which was validated in terms of selectivity, linearity, precision and recovery. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 0.4–2.8 μg/kg and 1.2–9.1 μg/kg, respectively, and the extraction recoveries were between 86 and 106% in all cases.

Palinological analysis

The palinological analysis was performed as described previously [20,22]. Briefly, pollen grains were isolated from each sample and cleaned up by the Erdtman method [64]. Species identification was performed using a photographic atlas [65,66] and the pollen slides reference collection at the CAR. Briefly, pollen were extracted by diluting 0.5 g in 10 ml of acidulated water (0.5% sulphuric acid) and then centrifuged at 2,500 rpm for 15 min. The pellet was washed with double-distilled (dd) water, centrifuged and resuspended in ddH₂O. 200 μl of this suspension was placed onto a glycerin jelly slide and examined microscopically in order to identify the pollen.

Ethics statement

In Europe, the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes laid the down the ethical framework for the use of animals in scientific experiments. The scope of this directive also includes specific invertebrate species, i.e. cephalopods, but no insects. Thus, according to European legislation no specific permits were required for the described studies.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Pairwise estimates of evolutionary divergence between 18S rDNA sequences (expressed as %).

Additional file 2: Table S2. Pairwise estimates of evolutionary divergence between GAPDH sequences (expressed as %).

Competing interests

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MH, AM, RMH and DCdG designed the study. AC, TG-M, MH, RMH carried out the experimental work of the pathogen analysis and cloning. AVGP carried out the experimental work of the palinological analysis. JLB and MJdN carried out the experimental work of the neonicotinoids analysis. CB and XM carried out the genetic analysis of trypanosomatids and neogregarines. JR carried out the experimental work of the virus analyses. MH, CB, JR, RMH and DCdG drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thanks J. Almagro, J. García, V. Albendea and T. Corrales of the honey bee pathology laboratory for their technical support. This study was supported by the Fund Research Foundation of Flanders (FWO-Vlaanderen G.0628.11), INIA-RTA2013-00042-C10-Subp(03-06), Consejería de Agricultura, Gobierno de Castilla-La Mancha, and MAGRAMA-FEAGA funds (Plan Apícola Nacional 2014).

Author details

¹Bee Pathology Laboratory, Consejería de Agricultura, Gobierno de Castilla-La Mancha, Centro Apícola Regional (CAR), Marchamalo E-19180, Spain.

²Laboratory of Zoophysiology, Faculty of Sciences, Ghent University, Ghent B-9000, Belgium. ³Grupo de Medicina Xenómica, CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago De Compostela E-15782, Spain.

⁴Xenómica Comparada de Parásitos Humanos, IDIS, Santiago De Compostela, Spain. ⁵Analytical Chemistry Group. I.U.CINQUIMA, Universidad de Valladolid, Valladolid E-47011, Spain. ⁶Departamento de Anatomía Patológica e Ciencias Forenses, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago De Compostela E-15782, Spain. ⁷Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid E-28040, Spain. ⁸Hive Products Laboratory, Consejería de Agricultura, Gobierno de Castilla-La Mancha, Centro Apícola Regional, Marchamalo E-19180, Spain. ⁹Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT-FEDER), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Albacete, Spain.

Received: 5 August 2014 Accepted: 5 September 2014

Published: 15 September 2014

References

- Ball BV, Allen MF: The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann Appl Biol* 1988, **113**:237-244.
- Faucon JP, Mathieu L, Ribiere M, Martel CA, Drajnudel P, Zeggane S, Aurieres C, Aubert MFA: Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee world* 2002, **83**:13-23.
- Nordström S, Fries I, Aarhus A, Hansen H, Korpela S: Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestations. *Apidologie* 1999, **30**:475-484.
- Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M: Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:7185-7191.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, VanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI: A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007, **318**:283-287.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A: *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 2006, **92**:93-95.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M: Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:6331-6338.
- Hatjina F, Tsoktouridis G, Bouga M, Charistos L, Evangelou V, Avtzis D, Meeus I, Brunain M, Smagghe G, de Graaf DC: Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *J Invertebr Pathol* 2011, **108**:131-134.
- Soroker V, Hetzroni A, Yakobson B, David D, David A, Voet H, Slabazki Y, Efrat H, Levski S, Kamer Y, Klinberg E, Zioni N, Inbar S, Chejanovsky N: Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 2011, **42**:192-199.
- Villa JD, Bourgeois AL, Danka RG: Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie* 2013, **44**:511-518.
- Lodesani M, Costa C, Besana A, Dall'Olio R, Franceschetti S, Tesoriero D, Vaccari G: Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *J Apic Res* 2014, **53**:155-164.
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC: Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 2013, **8**:e72443.
- VanEngelsdorp D, Meixner MD: A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 2010, **103**:80-95.
- Commission implementing regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 amending implementing regulation (EU) No 540/2011. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:EN:PDF>, Accessed 12 May 2014.
- Staveley JP, Law SA, Fairbrother A, Menzie CA: A causal analysis of observed declines in managed honey bees (*Apis mellifera*). *Hum Ecol Risk Assess* 2014, **20**:566-591.
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R: *Nosema ceranae* (microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep* 2013, **5**:17-29.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A, Genersch E: Five-year cohort study of *Nosema spp.* in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:3032-3038.
- Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Meana A, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bernal J: A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol Rep* 2010, **2**:243-250.
- Garrido-Bailón E: *Repercusión Potencial en la Cabaña Apícola Española de Agentes Nosógenos Detectados en Colonias de Apis Mellifera Iberiensis*, PhD Thesis. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal; 2012.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL: Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep* 2009, **1**:110-113.
- Higes M, Martín-Hernández R, García-Palencia P, Marín P, Meana A: Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep* 2009, **1**:495-498.
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego JC, Jiménez JJ, Bernal JL, Higes M: Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J Econ Entomol* 2010, **103**:1964-1971.
- Bernal J, Martín-Hernández R, Diego JC, Nozal MJ, González-Porto AV, Bernal JL, Higes M: An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Manag Sci* 2011, **67**:1320-1331.
- Antúñez K, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Martín-Hernández R, Higes M: Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res Vet Sci* 2012, **93**:1441-1445.
- Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M: Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or

- competition. Is *nosema ceranae* replacing *nosema apis*? *Environ Microbiol* 2012, **14**:2127–2138.
26. Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal JL, Martínez-Salvador A, Barrios L, Meana A, Higes M: **Short communication. The detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain.** *Spanish J Agric Res* 2010, **8**:658.
 27. Garrido-Bailón E, Bartolomé C, Prieto L, Botías C, Martínez-Salvador A, Meana A, Martín-Hernández R, Higes M: **The prevalence of *acarapis woodi* in Spanish honey bee (*apis mellifera*) colonies.** *Exp Parasitol* 2012, **132**:530–536.
 28. Garrido-Bailón E, Higes M, Martínez-Salvador A, Antúnez K, Botías C, Meana A, Prieto L, Martín-Hernández R: **The prevalence of the honeybee brood pathogens *ascosphaera apis*, *paenibacillus larvae* and *melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay.** *Microb Biotechnol* 2013, **6**:731–739.
 29. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Garrido-Bailón E, Nanetti A, Meana A, Higes M: ***Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies.** *Environ Microbiol Rep* 2012, **4**:57–65.
 30. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, García-Palencia P, Meana A: **How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse.** *Environ Microbiol* 2008, **10**:2659–2669.
 31. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A: ***Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis.** *Apidologie* 2010, **41**:375–392.
 32. Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juaranz A, Barrios L, Meana A, Nanetti A, Higes M: **The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies.** *Environ Microbiol* 2012, **14**:845–859.
 33. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M: ***Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level.** *Vet Res* 2013, **44**:25.
 34. Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M: **Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection.** *PLoS One* 2013, **8**:e58165.
 35. Borneck R, Viry A, Martín-Hernández R, Higes M: **Honey bee colony losses in the Jura region, France and related pathogens.** *J Apic Res* 2010, **49**:334–336.
 36. Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcato C, Gallina A, Mutinelli F: **Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies.** *J Invertebr Pathol* 2010, **105**:335–340.
 37. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N: **Dominance of *nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder.** *Apidologie* 2011, **42**:49–58.
 38. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z: **Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies.** *Apidologie* 2013, **44**:522–536.
 39. Hedtkke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E: **Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood.** *J Invertebr Pathol* 2011, **108**:167–173.
 40. Comman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, VanEngelsdorp D, Evans JD: **Pathogen webs in collapsing honey bee colonies.** *PLoS One* 2012, **7**:e43562.
 41. Granberg F, Vicente-Rubiano M, Rubio-Guerri C, Karlsson OE, Kukielka D, Belák S, Sánchez-Vizcaíno JM: **Metagenomic detection of viral pathogens in Spanish honeybees: co-infection by aphid lethal paralysis, israel acute paralysis and lake sinai viruses.** *PLoS One* 2013, **8**:e57459.
 42. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL: **Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*.** *PLoS One* 2011, **6**:e20656.
 43. Rutrecht ST, Brown MJF: **The life-history impact and implications of multiple parasites for bumble bee queens.** *Int J Parasitol* 2008, **38**:799–808.
 44. Meeus I, de Graaf DC, Jans K, Smagghe G: **Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers.** *J Appl Microbiol* 2010, **109**:107–115.
 45. Plischuk S, Meeus I, Smagghe G, Lange CE: ***Apicystis bombi* (apicomplexa: neogregarinorida) parasitizing *apis mellifera* and *bombus terrestris* (hymenoptera: apidae) in Argentina.** *Environ Microbiol Rep* 2011, **3**:565–568.
 46. Maharramov J, Meeus I, Maebe K, Arbetman M, Morales C, Graystock P, Hughes WOH, Plischuk S, Lange CE, de Graaf DC, Zapata N, de La Rosa JJ P, Murray TE, Brown MJF, Smagghe G: **Genetic variability of the neogregarine *Apicystis bombi*, an etiological agent of an emergent bumblebee disease.** *PLoS One* 2013, **8**:e81475.
 47. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Peng G, Kadowaki T: **Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan.** *Environ Microbiol Rep* 2013, **5**:74–77.
 48. Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM: **The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods.** *Annu Rev Entomol* 2007, **52**:81–106.
 49. Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L: **Neural effects of insecticides in the honey bee.** *Apidologie* 2012, **43**:348–370.
 50. Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A: **A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees.** *Science* 2012, **336**:348–350.
 51. VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS: **Colony collapse disorder: a descriptive study.** *PLoS One* 2009, **4**:e6481.
 52. Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M: **Pesticides and honey bee toxicity – USA.** *Apidologie* 2010, **41**:312–331.
 53. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS: **High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health.** *PLoS One* 2010, **5**:e9754.
 54. Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'Hostis M, Wiest L, Buleté A, Delbac F, Pouliquen H: **Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France.** *PLoS One* 2013, **8**:e67007.
 55. Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, VanEngelsdorp D: **Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*.** *PLoS One* 2013, **8**:e70182.
 56. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P: **Predictive markers of honey bee colony collapse.** *PLoS One* 2012, **7**:e32151.
 57. Farooqui T: **A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis.** *Neurochem Int* 2013, **62**:122–136.
 58. Popp M, Lattorff HMG: **A quantitative *in vitro* cultivation technique to determine cell number and growth rates in strains of crithidia bombi (trypanosomatidae), a parasite of bumblebees.** *J Eukaryot Microbiol* 2011, **58**:7–10.
 59. De Smet L, Ravoet J, de Miranda JR, Wenseleers T, Mueller MY, Moritz RFA, de Graaf DC: **BeeDoctor, a versatile MLPA-based diagnostic tool for screening bee viruses.** *PLoS One* 2012, **7**:e47953.
 60. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, **41**:95–98.
 61. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
 62. Jukes TH, Cantor CR: **Evolution of Protein Molecules.** In *Mammalian Protein Metabolism*. Volume 11th edition. Edited by Munro HN. New York: Academic; 1969:21–132.
 63. Yáñez KP, Martín MT, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J: **Trace analysis of seven neonicotinoid insecticides in bee pollen by solid-liquid extraction and liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry.** *Food Anal Methods* 2014, **7**:490–499.
 64. Erdtman G: **Handbook of palynology, morphology, taxonomy, ecology: an introduction to the study of pollen grains and spores.** Copenhagen, Denmark: Munksgaard; 1969.
 65. Valdés B: **Atlas Polínico de Andalucía Occidental.** Sevilla, Spain: Univ Sevilla; 1987.
 66. Faegri K, Iversen J: **Textbook of Pollen Analysis.** 4th edition. Copenhagen Denmark: Munksgaard; 1989.

doi:10.1186/1756-0500-7-649

Cite this article as: Cepero et al.: Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. BMC Research Notes 2014 7:649.

ANEXO IV

Cepero y col., 2014b



SHORT REPORT

Open Access

A two year national surveillance for *Aethina tumida* reflects its absence in Spain

Almudena Cepero¹, Mariano Higes¹, Amparo Martínez-Salvador², Aránzazu Meana³ and Raquel Martín-Hernández^{1,4*}

Abstract

Background: The Small Hive Beetle (SHB) is considered one of the major threats to the long-term sustainability and economic success of honey bee colonies in Europe. The risk of introduction into the EU had been reported as moderate to high. Indeed, it has been recently reported an outbreak in the south of Italy. Here, the presence of *Aethina tumida* in beekeeping farms in Spain was evaluated using a previously described qPCR protocol.

Findings: When hive debris from 398 colonies (collected in 2010 and 2011) was analysed, grouped by region, SHB were not detected in any of the samples, making it unnecessary to analyse the samples individually.

Conclusion: The SHB free-status is shown. This epidemiological surveillance would appear to be useful to detect the possible future entry of this pathogen.

Keywords: *Apis mellifera*, Small hive beetle, *Aethina tumida*, Surveillance

Findings

Introduction

Exotic diseases or pests are infectious, parasitic diseases or arthropods that are not native to a particular region either because they have never been present there or because they were eradicated and then kept out by government control measures. The impact of exotic agents varies considerably depending on the species and the area under invasion. International and government bodies enforce specific regulations and policies to avoid the entrance and/or dissemination of such exotic organisms, establishing preventative controls and contingency plans.

In terms of beekeeping, the Small Hive Beetle (SHB; *Aethina tumida*) is considered one of the major worldwide threats to the long-term sustainability and economic success of colonies in Europe [1]. This beetle is originated from Africa where it is considered a minor pest of bee colonies, causing little harm, however the beetle can multiply to huge numbers within infested colonies in other geographical areas. Since SHB was discovered outside of its

native range in 1996, it has been reported in many different countries including the United States, Canada, Australia, Mexico, Jamaica and Cuba where it has spread [1-4]. The larvae of this beetle eat brood, honey and pollen; they destroy combs and cause fermentation, spoiling the honey. These severe consequences of infestation become further exaggerated as the beetle populations become established in these areas with little or no chance of eradication [3] although some biological requirements of the beetles may limit/enhance their reproductive potential in various soil environments (especially in dry climates) [5].

In 2004, the alarm of infestation was raised in Portugal, although the affected colonies were destroyed immediately [4]. Very recently, Italy has reported an outbreak in the south of the country. It started in Reggio di Calabria but nowadays SHB has spread up to the near province of Vibo Valentia. Up to 4 November 2014, adults of *A. tumida* have been observed in 52 apiaries [6,7]. Previously, the Panel on Animal Health and Welfare of the European Food Safety Authority (EFSA) [8] had reported a moderate to high risk of the introduction of SHB into the EU through the importation of live queen bees, swarms and colonies from third countries, and due to the trafficking of other bee products and of accidental bee importation.

* Correspondence: rmhernandez@jccm.es

¹Centro Apícola de Marchamalo, Consejería de Agricultura, Castilla-La Mancha, Camino de San Martín s/n, 19180 Guadalajara, Spain

⁴Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete (INCRECYT- FEDER), Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Indeed, non-bee products as ripe fruits, used beekeeping equipment and soil also represent a moderate risk for SHB entry.

Surveillance and reporting are important practices in the early detection of exotic pests and diseases, helping to maintain effective biosecurity controls. In beekeeping, these activities involve collecting, analysing and interpreting information on the presence or absence of pests and diseases, and the reporting of any unusual or suspect detection to the relevant authorities. In preparation for the detection of exotic pests and the supervision of other common honey bee diseases, a surveillance program has been developed over recent years in Spain. As part of this study, the possible presence of *A. tumida* in honey bee colonies in Spain is evaluated by qPCR, employing a protocol previously described to detect this pathogen in hive debris [9].

Material and methods

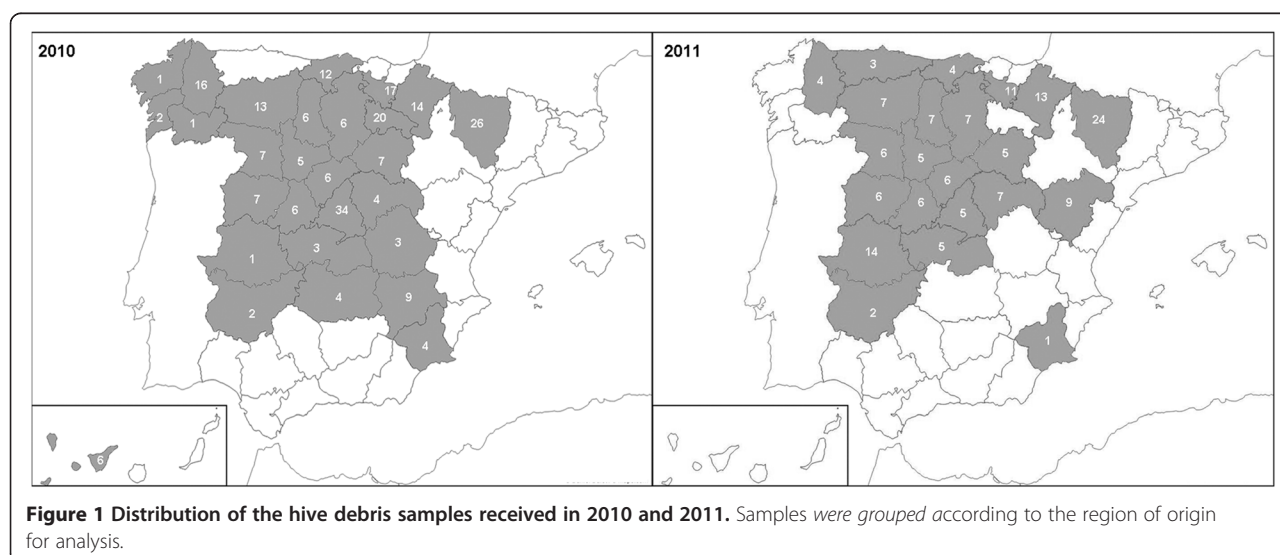
The monitoring study was carried out during 2010 and 2011. This program involved active and passive samplings and it was designed to determine the prevalence of most honey bee pathogens and of pesticides around the country. Consequently, the number of colonies to be sampled was calculated according to the number of apiaries registered in 2009 [10], with an expected prevalence of the main honey bee pathogens of around 40%, a precision rate of 10% and a confidence level of 95% as developed in a previous study [11]. Samples were then studied in accordance with the number of apiaries in each region, from which colonies were selected at random (Figure 1).

Each participating beekeeper or the veterinary services of each region were asked to send a plastic jar (125 ml) with the debris of the bottom of six hives randomly

selected (bees and brood from the same six hives were also sent for other different studies). As such, a total of 398 samples of hive debris (8.5 g per the six colonies as average) were collected (241 in 2010 and 157 in 2011) and transferred to the laboratory. Given that *A. tumida* had not previously been detected in Spain, the hive debris samples were pooled by regions (Figure 1) for an initial analysis, after which single sample analysis could be carried out in the case of detection.

To prepare the grouped samples, 5 g from each sample of debris was introduced into a double bag strainer (Seward, BA6040) and after the addition of 18 ml of milliQ water (MQW), the sample was crushed in a Stomacher 80 (Biomaster) for 120 seconds. Subsequently, 9 ml of MQW was added and the suspension was homogenised again (60 secs). The macerate obtained was collected in a 50 ml tube and centrifuged at $1,751 \times g$ for 10 minutes, the supernatant was discarded and 1 ml of MQW was added to the pellet. Afterwards, an aliquot of 50 mg (on average) from the pellet corresponding to a region was re-suspended in 3 ml of MQW and homogenised, and 400 μ l were added to a 96-well plate and processed for DNA extraction as described [12], some wells with water alone were included as negative controls. The plates were then frozen at -20°C until use. Positive controls of SHB larvae and adults (kindly provided by Dr J. Ellis) were included too.

To assess whether the system was suitable to detect the SHB when present at a low levels, one SHB larvae was added to one sample of hive debris and processed as described above. This sample was grouped with the samples from the region of Madrid collected in 2010, which represented the most unfavourable situation, where 34 samples were grouped for the collective analysis (Figure 1), and this sample acted as a second positive control.



Real-time PCR was performed in a LightCycler 480 (Roche) using the LightCycler 480 Probes Master mix (Roche, 04887301001), and PCR were carried out as described by Ward et al. [9]. The efficiency of the PCR reaction was assessed using DNA extracted from 2 SHB larvae and 2 adult SHB per triplicate.

Results

We analysed samples coming from 10 Autonomous Communities. The analysed regions represented the 59.62% in 2010 and 57.13% in 2012 of the total beekeeping farms declared in Spain for those years [10].

As expected, all the hive debris samples analysed from Spanish colonies were negative and thus, further analysis of the independent samples was not necessary. The method used was able to detect the DNA from just one SHB larva in the second positive control sample, validating the failure to detect the pathogen in the samples. The efficiency of the PCR that we get was 93.35% for SHB larvae and 95.5% for SHB adults. Accordingly, the method described proved to be a valuable tool in the surveillance efforts to identify the appearance of this species, since it permits rapid screening of hive debris, as it can detect DNA from SHB eggs, larvae and adult specimens [9].

Discussion

Effective control of honey bee pests and diseases is important to maintain sustainable and healthy honey bee populations for pollination and honey production, thereby contributing to national and international food security and biodiversity objectives. Although SHB had not been reported or suspected previously in our country, the only way to guarantee its absence is through epidemiological surveys that validate the SHB pest free status. Moreover, Spain is supposed to be a susceptible area for SHB pest establishment since its share climatological and biogeographical characteristics with other countries, where the beetle has been able to spread out. Indeed, the most of Spain presents ecological zones similar than those at the Southern Italy where the SHB has been reported in September, 2014.

The fact that SHB have managed to establish populations in many territories of the USA and Australia suggested that late recognition of this pest in an area prevents its eradication [1] and that supports the necessity of the development of surveillance systems implemented in every country. For example, the identification of this pest was reported two years after its introduction in USA [1,13] and 12–18 months after the first alert by beekeepers suspicion in Australia (cited in [1]).

Despite strict controls at customs, uncontrolled trading may lead to the invasion of exotic pests or diseases within a territory. Our system of epidemiological surveillance

could be useful to detect the possible entry of this pathogen in our country at an early stage of invasion. Even though the surveillance method was design in a broader study to be able to detect other pathogens, not only SHB, the precision rate of this study have a good reliability for the detection of this pest as we have analysed the hive debris from 6 colonies per apiary distributed in areas with a high census of colonies. All the analysed samples were negative, confirming that Spain was free of this pest during the sampled years. Although the veterinary services were asked to be directly involved in the collection of the samples, finally some beekeepers sampled by themselves and this could bias the randomly selection somehow. In any case, there is a very low probability that this could modify the results on the SHB free status of the country.

This monitoring system allows a large number of samples to be processed rapidly, and in an economical and reliable way. Actions such as that described are important for protecting beekeeping activity by detecting exotic pests and diseases early, and to validate control and regulatory measures for established pests and diseases. After the recent outbreak in Italy, measures for monitoring and control for the eradication of the parasite include inspections in all apiaries within a radius of 20 km from the place of the event locations were transhumance is practicing [6,7]. The implantation of a surveillance procedure in each country together with the setting of the molecular technique [9] for a fast and accurate detection could help to limit the spreading of this pest in areas monitored around outbreaks.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Authors' contributions

RMH, MH, AM conceived and designed the experiments. AC, MH, RMH performed the experiments and analysed the data. AMS performed the epidemiological design. AC, MH, RMH wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Funded by INIA-FEDER (RTA2008-00020-C02) and Consejería de Agricultura (Gobierno de Castilla – La Mancha). We thank to Dr. James Ellis (University of Florida) for providing us Small Hive Beetle adult and larvae for controls.

Author details

¹Centro Apícola de Marchamalo, Consejería de Agricultura, Castilla-La Mancha, Camino de San Martín s/n, 19180 Guadalajara, Spain. ²Epidemiology Consultant, C/Puente la Reina, 28050, Madrid, Spain. ³Animal Health, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. ⁴Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete (INCRECYT- FEDER), Madrid, Spain.

Received: 7 May 2014 Accepted: 28 November 2014

Published: 5 December 2014

References

1. Neumann P, Ellis JD: The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *J Apicultural Res* 2008, **47**:180–183.

2. Neumann P, Evans JD, Pettis JS, Pirk CWW, Schäfer MO, Tanner G, Ellis JD: **Standard methods for small hive beetle research.** *J Apicultural Res* 2013, **52**:1–32.
3. FERA: *The Small Hive Beetle a serious threat to European apiculture.* Sand Hutton: York: The Food and Environment Research Agency; 2013:32.
4. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.2.5: **Small hive beetle infestation (*Aethina tumida*).** Edited by Office International des Épizooties (OIE). ; 2013. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.05_SMALL_HIVE_BEETLE.pdf; accessed on 14-04-2014.
5. Ellis JD, Hepburn HR, Luckmann B, Elzen PJ: **The effects of soil type, moisture, and density on pupation success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae).** *Environ Entomol* 2004, **33**:794–798.
6. National Reference Laboratory for beekeeping: ***Aethina tumida* confirmed cases. Epidemiological situation as of November 05, 2014.** Edited by Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. [http://www.izsvenezie.it/index.php?option=com_content&view=article&id=1731&Itemid=893]; accessed on 6-11-2014.
7. European Union Reference Laboratory for honey bee health: **Detection of *Aethina tumida* (small hive beetle) in Southern Italy.** [<https://sites.anses.fr/en/minisite/abeilles/detection-aethina-tumida-small-hive-beetle-southern-italy-0>]; accessed on 6-11-2014.
8. European Food Safety Authority (EFSA). Panel on Animal Health and Welfare: **Scientific Opinion on the risk of entry of *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* spp. in the EU.** *EFSA J* 2013, **11**(3):3128. [<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3128.pdf>]; accessed on 14-04-2014.
9. Ward L, Brown M, Newmann P, Wilkins S, Pettis J, Boonham N: **A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*).** *Apidologie* 2007, **38**:272–280.
10. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA): **El sector de la miel en cifras. Principales indicadores económicos en 2012.** [http://www.asaja.com/files/sectoriales/27062014095857_INDICADORES_ECONOMICOS_SECTOR_DE_LA_MIEL_2013_tcm7-331641.pdf]; accessed on 04-12-2013.
11. Garrido-Bailón E: **Repercusión potencial en la cabaña apícola española de agentes nosógenos detectados en colonias de *Apis mellifera iberiensis*.** In *PhD thesis*. Edited by Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal; 2012. [<http://eprints.ucm.es/17903/1/T34122.pdf>]; accessed on 14-04-2014.
12. Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González Porto A, Martínez-Salvador A, de la Rúa P, Meana A, Higes M: **The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade.** *Res Vet Sci* 2012, **93**:150–155.
13. Hood WM: **The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review.** *Bee World* 2004, **85**:51–59.

doi:10.1186/1756-0500-7-878

Cite this article as: Cepero et al.: A two year national surveillance for *Aethina tumida* reflects its absence in Spain. *BMC Research Notes* 2014 7:878.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO V

Cepero y col., 2015a



Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its prevalence

A. Cepero · R. Martín-Hernández · L. Prieto · T. Gómez-Moracho ·
A. Martínez-Salvador · C. Bartolomé · X. Maside · A. Meana · M. Higes

Received: 29 October 2014 / Accepted: 6 November 2014 / Published online: 18 November 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Acarapisosis is a disease of the adult honey bee *Apis mellifera* L., caused by the tracheal mite *Acarapis woodi* (Rennie), that affects the prothoracic tracheas of worker honey bees. Although it is not usually considered a real problem for honey bee colonies in southern Europe (mainly Spain and Greece), where the majority of professional beekeepers are located in Europe, recent works have reported the constant presence of this mite in this area, making it a potential cofactor for colony losses. In this study, we developed a specific PCR diagnostic tool that improves the techniques used so far and allowed us to confirm the presence of this parasite in Spain, urging the need to monitor its prevalence and implications in the health of the colonies. Indeed, in a total of 635 apiaries analysed, the prevalence of *A. woodi* in 2010 was 8.3 and 4 % in 2011. The mite is present in bee colonies over time and should not be underestimated as a possible cofactor in the collapse of bee colonies. Additionally, some positive samples were cloned so a genetic analysis on the diversity within *A. woodi* isolates was also approached. This allowed us to identify different genetic variants within an isolate, even when

they were present at low frequencies. And this genetic analysis revealed the existence of a different clade of *Acarapis* sequences that could represent a new species or subspecies, although more research is required to verify the identity of this novel lineage at genetic and morphological level.

Keywords Parasites · *Acarapis woodi* · Diagnosis · Genetic variability · Honey bee colony losses

Introduction

Acarapisosis is a disease of the adult honey bee (*Apis mellifera*) caused by the microscopic tracheal mite, *Acarapis woodi* (Rennie), which primarily lives and reproduces in the large prothoracic trachea (OIE 2008). The pathogenic effect of this mite on individual bees depends on the number of parasites within the tracheae. Indeed, they can be attributed to both mechanical injuries and to physiological disorders resulting from the obstruction of the air ducts, to lesions in the tracheal

A. Cepero · R. Martín-Hernández · T. Gómez-Moracho ·
M. Higes (✉)
Laboratorio de Patología Apícola, Consejería de Agricultura, Junta
de Comunidades de Castilla-La Mancha, Centro Apícola Regional
(CAR), San Martín s/n. 19180 Marchamalo, Guadalajara, Spain
e-mail: mhiges@jccm.es

R. Martín-Hernández
Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete
(INCRECYT-FEDER), Madrid, Spain

A. Martínez-Salvador
C/ Puente la Reina, 28050 Madrid, Spain

C. Bartolomé · X. Maside
Departamento de Anatomía Patológica e Ciencias Forenses,
Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de
Compostela, Galicia, Spain

C. Bartolomé · X. Maside
Grupo de Medicina Xenómica, CIMUS, Universidade de Santiago
de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain

C. Bartolomé · X. Maside
Grupo de Xenómica Comparada de Parásitos Humanos, IDIS,
Santiago de Compostela, Galicia, Spain

A. Meana
Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad
Complutense, 28040 Madrid, Spain

L. Prieto
Comisaría General de la Policía Científica, DNA Laboratory,
Instituto Universitario de Investigación en ciencias policiales
(IUICP), Madrid, Spain

ANEXO VI

Cepero y col., 2015b



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Accepted in Journal of Apicultural Research: 10/03/2015

Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse

Almudena Cepero^a, Raquel Martín-Hernández^{a,b}, Carolina Bartolome^c, Tamara Gómez-Moracho^{a,c,d}, Laura Barrios^e, José Bernal^f, María Teresa Martín^f, Aránzazu Meana^g, Mariano Higes^{a*}

^a Laboratorio de Patología Apícola, Centro Apícola Regional (CAR), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, 19180 Marchamalo, Spain.

^b Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y Tecnología (INCRECYT), Parque Científico de Albacete, Spain.

^c Grupo de Medicina Xenómica, CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

^d Grupo de Xenómica Comparada de Parásitos Humanos, IDIS, Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

^e Statistics Department, CTI, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28006 Madrid, Spain.

^f IU CINQUIMA, Analytical Chemistry Group, University of Valladolid, 47011, Valladolid, Spain.

^g Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

*** Corresponding author: Mariano Higes, Laboratorio de Patología Apícola (CAR), 19180 Marchamalo, Guadalajara (Spain). Mail: mhiges@iccm.es**

Summary

Many European and North American countries have reported losses in honey bee populations over recent years. Although multiple factors appear to be involved in this decline, the influence of pathogens may be particularly important. In the present study, we analyzed the presence of the major honey bee pathogens and neonicotinoid insecticides in ten professional apiaries (five affected by high honey bee colony mortality and five asymptomatic apiaries). Our results confirm that *Nosema ceranae* and trypanosomatids are very prevalent in the apiaries affected by depopulation and high colony loss, and that they are at least in part responsible for colony collapse. By contrast, and while they have been demonstrated to be highly toxic to bees, neonicotinoid insecticides do not seem to play an important role in colony mortality in these apiaries. This kind of passive surveillance system is important to collect information about pathogen incidence, particularly when supplemented with a strong system of active disease surveillance that enables emergent diseases to be detected.

Resumen

En anteriores años, en diversos países de Europa y América del Norte se han reportado pérdidas de colonias de abejas. Aunque son varios los factores que pueden estar implicados en esta problemática, los patógenos juegan un papel destacado en este declive. En el presente estudio, se analizó la presencia de los principales patógenos de las abejas así como insecticidas neonicotinoides en 10 apiarios profesionales afectados por una elevada mortalidad de colonias de abejas, o asintomáticos. Los resultados confirman que *Nosema ceranae* y el grupo de los Tripanosomátidos son muy prevalentes en los apiarios que mostraron síntomas de despoblamiento y alta mortalidad de colonias de abejas y pueden jugar un importante papel en el colapso de las colonias. Por el contrario, y aunque los insecticidas neonicotinoides se han mostrado como altamente tóxicos para las abejas, éstos no juegan un importante papel en la mortalidad de las colonias de abejas estudiadas. Nuestro trabajo demuestra que un sistema de vigilancia pasiva es importante para registrar la incidencia de los patógenos particularmente cuando está apoyado en un fuerte sistema de vigilancia activa que permita detectar enfermedades emergentes.

Key words: Microsporidia, Trypanosomatids, pathogens, neonicotinoids, honey bee colony collapse, passive surveillance.

Introduction

The honey bee (*Apis mellifera*) is highly valued throughout the world for both the production of honey and for its ecological importance in the pollination of many economically important crops (Staveley *et al.*, 2014). In recent years, many European and North American countries have reported serious losses in honey bee populations (Van der Zee *et al.*, 2012), and other pollinator populations also appear to be on the decline (Evison *et al.*, 2012). The loss of honey production due to the decline in health of honey bee colonies (Botías *et al.*, 2012) may be more important in temperate areas where professional beekeeping is fundamentally dedicated to honey production, the main product of the beekeeping industry. In Europe, Spain is the country with the largest number of honey bee colonies (around 2.5 million), with a mean number of 103 colonies per beekeeper. Spain also has the highest proportion of professionals per capita, who produce 31.8 thousand tonnes of honey per annum (MARM 2007; Chauzat *et al.*, 2013). In the light of these figures, the decrease of honey production in Spain is a major concern for professional beekeepers.

There are a multitude of factors that might be related to the decline in pollinators, including land use change, pesticide exposure, reduction in genetic diversity, climate change, etc. (Potts *et al.*, 2010; Ratnieks and Carreck, 2010; Staveley *et al.*, 2014). However, pathogens (mainly parasites) may represent one of the factors that has a particularly important impact on this decline, especially given that they represent a key selection pressure for most organisms, including insects (Evison *et al.*, 2012).

In order to rapidly detect potential disease outbreaks or changes in honey bee health, a passive disease surveillance system is currently being developed at the pathology laboratory of the CAR (Centro Apícola Regional). Passive surveillance involves the routine gathering of information on disease incidence from different sources and at different levels (see World Health Organization definition). In our case, beekeepers and veterinary field officers perform the sampling of bee colonies and we receive these samples in the lab for a "passive" analysis.

Materials and methods

Of all the cases reported to the CAR, in this study five apiaries (A apiaries) with type C noseiosis (see Higes *et al.*, 2008, 2010; Botías *et al.*, 2013) or CCD-like symptoms (VanEngelsdorp *et al.*, 2009) - severe colony loss (between 70 and 90%), diminished adult population and/or low honey yields - and five routinely analysed asymptomatic apiaries (B apiaries) were selected (see Table 1 for relevant data on the samples received). These corresponded to professional apiaries located in different provinces (Table 1). Four of the group A apiaries were located in areas where only wild flora was available to the bees and only one (A3-Cuenca) was located near hybrid sunflower crops. In this latter case, the beekeeper suspected an intoxication of the honeybee colonies by neonicotinoids. Apiaries of group B were located in places where only wild flora was available to the bees.

To determine the main honey bee pathogens, each sample was processed and the DNA was extracted as described previously (Martín-Hernández *et al.*, 2012). *Varroa destructor* was detected visually as described in the OIE methods (OIE, 2008). By contrast, isolates were analysed by PCR to detect *Nosema* spp., (Martín-Hernández *et al.*, 2012), Trypanosomatids (e.g. *Crithidia* spp.) and Neogregarida (e.g. *Apicystis* spp.: according to Meeus *et al.*, 2010), and *Acarapis woodi* (Garrido-Bailón *et al.*, 2012; Cepero *et al.*, 2014a).

Given the problematic taxonomic classification of trypanosomatids (Cepero *et al.*, 2014b), all the PCR products of positive samples were purified and sequenced as described elsewhere (Gómez-Moracho *et al.*, 2013). The sequences obtained were assembled, aligned and checked for accurate base calling using CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). The alignments were edited with BioEdit (Hall, 1999) and the identity of the sequences was assessed through a BLAST nucleotide search.

Samples of bee bread (more than 100g each) were collected from the brood chambers as described elsewhere (Bernal *et al.*, 2010) and they were analysed for residues of the following neonicotinoids: acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, thiacloprid and thiamethoxam (according to Yáñez *et al.*, 2014).

To compare the prevalence of each nosogenic agent in symptomatic and asymptomatic honey bee colonies, chi-squared, Cochran's Q (k related-samples non-parametric test) and McNemar's tests were performed. Differences were considered statistically significant when $\alpha = 0.05$. All analyses were carried out using SPSS software version 21.0.

Results

The most prevalent pathogen identified in all the samples studied here was *N. ceranae*, which was found in samples from all the apiaries in group A but in only one of those in group B (Table 2). Accordingly, the prevalence of *N. ceranae* was significantly higher in the symptomatic colonies In group A ($p < 0.0001$).

To date, very little information has been gathered about the incidence of honey bee Trypanosomatids in Spain (such as *Crithidia mellificae*). In this study, this group of pathogens was found in 67% of the samples from four of the five apiaries in group A, yet in none of those from group B. As such, the presence of Trypanosomatids was significantly higher in honeybee colonies from Group A ($p < 0.0001$). The 10 trypanosomatid sequences obtained by direct sequencing of the PCR products (accession numbers KJ410352 to KJ410361: Table 2) were all identical and they showed 100% identity with two presumed *C. mellificae* sequences deposited in GenBank (KF607064.1 and AB745488.1). These sequences are now known to correspond to a separate lineage that, at this locus, differs in a single nucleotide mutation from the *C. mellificae* reference strain ATCC30254 (Cepero *et al.*, 2014b). Moreover, the combination of *N. ceranae* and Trypanosomatids in the same sample was significantly higher in bee colonies that displayed symptoms of depopulation (group A).

The arachnid parasite *A. woodi* was found in 47% of the samples (7 out of 15) and it was significantly more prevalent in group A apiaries ($p < 0.0001$). In accordance with previous active surveillance data (Garrido-Bailón *et al.*, 2012), *A. woodi* was not detected in group B apiaries. By contrast, *Nosema apis* and *V. destructor* were found in just one of the samples from group A (7%), whereas *N. apis* was not detected in any samples from group B and *V. destructor* was detected in two of five samples from these apiaries (40%). Neogregarinorida were not detected in any samples. The *V. destructor* mite is a serious and devastating ectoparasite of honey bees worldwide (OIE 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010). Indeed, *V. destructor* is currently a high-profile suspect to participate in the collapse of bee colonies (Dainat *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2013). However, we only detected *Varroa* mites in two samples, which suggests that despite being a first order pathogen *V. destructor* does not appear to be highly prevalent in the apiaries. In Spain legislation exists regarding the control of varroosis (RD608/2006), requiring the application of a veterinary product to control this mite during autumn. Based on the results obtained here, this control would appear to be effective in the apiaries studied.

In addition, six samples from three of the five apiaries of group A were simultaneously co-parasitized with *N. ceranae*, *A. woodi* and Trypanosomatids. This co-parasitization was significantly higher ($p > 0.001$) in the symptomatic colonies than in the asymptomatic ones. Finally, no neonicotinoid residues were detected in the bee bread.

Discussion

Passive surveillance is a suitable method to detect the incidence of the main honey bee pathogens and their role in colony collapse (Cepero *et al.*, 2014b), as investigated here. As suspected and due to the higher prevalence in Spain (Martín-Hernández *et al.*, 2012), *N. ceranae* was the most prevalent pathogen in the collapsing colonies studied here, and it was much more prevalent in apiaries showing symptoms of adult bee loss and collapse (100%) than in asymptomatic apiaries (20%), in accordance with recent studies (Cepero *et al.*, 2014b). This pathogen has been shown to have a detrimental effect on honey bees at the individual (Higes *et al.*, 2007, 2013; Aliferis *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2012, 2013a; McDonnell *et al.*, 2013; Aufauvre *et al.*, 2014) and colony levels in different areas of the world (Higes *et al.*, 2008; Botías *et al.*, 2012, 2013; Dussaubat *et al.*, 2013b; Goblirsch *et al.*, 2013; Villa *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2014). Likewise, its detrimental effects have been associated with a set of circumstances concerning the time of entry of the pathogen into the colony (Betti *et al.*, 2014) and the number of diseased bees (Higes *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2015).

Until now *C. mellificae* (Langridge and McGhee, 1967) was thought to be the only trypanosomatid infecting honey bees, and although its true impact on their health remains unclear, recent studies linked its presence in bee colonies (alone or with *N. ceranae*) with higher winter mortality (Ravoet *et al.*, 2013). Moreover, an association between these two pathogens was also reported in the USA (Runckel *et al.*, 2011) and Belgium (Ravoet *et al.*, 2013). Indeed, the current study identifies a very high prevalence of trypanosomatids in depopulated apiaries of group A, and not in apiaries of group B. However, the taxonomy of Trypanosomatidae is not straightforward, in part

because members of this family cannot be classified using a highly conserved marker like the *18S rDNA* gene as the sequences obtained exhibit 99% identity with trypanosomatids from various genus (*Leptomonas*, *Crithidia*, *Leishmania*, *Wallaceina*, *Blastocrithidia* and *Endotrypanum*). Thus, other loci should be used. The second is that the recent finding of a new lineage infecting honey bees (Cepero et al., 2014b) may invalidate the reports linking *C. mellificae* and colony collapse, as most –if not all- the sequences available in GenBank are wrongly attributed to this species (Cepero et al., 2014b). In fact, the sequences obtained in the current study (only from depopulated apiaries) correspond to this new lineage and not to *C. mellificae*.

A. woodi was also present in 3 of 5 apiaries of group A, yet it was not detected in colonies of group B. Again, when this mite appears in co-infection with other more prevalent pathogens (such as *Nosema* spp., *V. destructor* or Trypanosomatids) it can produce a significant negative effect on the viability of bee colonies, a phenomenon that should not be forgotten. *V. destructor* and associated virus are currently high-profile suspects to participate in the collapse of bee colonies (Francis et al., 2013; Meixner et al., 2014). However, in the apiaries studied we only detected *Varroa* mite in three samples, none of which had the typical symptoms of varroosis. A similar situation appears to occur in the case of *N. apis*, which was also detected in one sample.

Neonicotinoids are highly toxic to bees (see for example Desneux et al., 2007; Belzunces et al., 2012) and although their true role in colony loss is not clear, it is unlikely to be the sole cause (VanEngelsdorp et al., 2009; VanEngelsdorp and Meixner, 2010). Indeed, a higher prevalence of acaricides, herbicides or insecticides is often noted in hives rather than neonicotinoids or phenylpyrazoles (Bernal et al., 2010, 2011; Johnson et al., 2010; Mullin et al., 2010; Lambert et al., 2013; Pettis et al., 2013). Thus, our results confirm that neonicotinoids are unlikely to be the sole cause of honey bee colony collapse.

The main conclusions of our study are that: 1) pathogens are highly prevalent in depopulated symptomatic colonies; 2) all the pathogens detected can potentially produce a substantial reduction in host fitness and such effects are probably exacerbated when more than one pathogen coincides; and finally, 3) although neonicotinoids are very toxic to bees, they do not seem to play an important role in the symptoms of the colonies analyzed. These results are in agreement with earlier data (Cepero et al., 2014b) and they confirm the need to control parasites (such as *N. ceranae*) in order to ensure the health of bee colonies and to prevent their collapse. Further studies into the interaction of these pathogens and the appearance of new viruses (Ravoet et al., 2013) should be carried out, especially when combined with the most prevalent pathogens like *N. ceranae*. Such passive surveillance systems are important to collect disease information and pathogen incidence, and when supplemented by a strong system of active disease surveillance, they are particularly useful to detect emergent animal diseases.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interests to declare

Acknowledgments

The authors wish to thank J. Almagro, J. García, V. Albendea and T. Corrales of the honey bee pathology laboratory for their technical support. We also thank Dr DeGraaf and J. Ravoet for supplying the ATCC30254 reference strain, and for their comments on *C. mellifica*e. Financial support for this work was provided by the Gobierno de Castilla-La Mancha (Consejería de Agricultura), MAGRAMA-FEAGA (Plan Apícola Nacional 2013) and INIA-FEDER (RTA2013-00042-C10-06).

References

- ALIFERIS, K A; COPLEY, T; JABAJI, S (2012) Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology*, 58(10): 1349–1359. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.010>
- AUFAUVRE, J ; MISME-AUCOUTURIER, B ; VIGUÈS, B ; TEXIER, C ; DELBAC, F ; BLOT, N (2014) Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PloS One*, 9(3): e91686. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091686>
- BELZUNCES, L P ; TCHAMITCHIAN, S ; BRUNET, J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43(3): 348–370. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-012-0134-0>
- BERNAL, J ; GARRIDO-BAILÓN, E ; DEL NOZAL, M J; GONZÁLEZ-PORTO, A V, MARTÍN-HERNÁNDEZ, R; DIEGO, J C ;JIMÉNEZ, J J; BERNAL J L; HIGES, M (2010). Overview of Pesticide Residues in Stored Pollen and Their Potential Effect on Bee Colony (*Apis mellifera*) Losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, 103(6): 1964–1971. <http://dx.doi.org/10.1603/EC10235>
- BERNAL, J ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; DIEGO, J C; NOZAL, M J, GONZALEZ-PORTO, A V; BERNAL, J L ; HIGES, M (2011) An exposure study to assess the potential impact of fipronil in treated sunflower seeds on honey bee colony losses in Spain. *Pest Management Science*, 67(10): 1320–31. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.2188>
- BETTI, M I ; WAHL, L M ; ZAMIR, M (2014) Effects of infection on honey bee population dynamics: a model. *PloS One*, 9(10): e110237. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110237>
- BOTÍAS, C ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; DÍAS, J ; GARCÍA-PALENCIA, P ; MATABUENA, M ; JUARRANZ, A ; BARRIOS, L ; MEANA, A ; NANETTI, A ; HIGES, M (2012) The effect of induced queen replacement on *Nosema spp.* infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology*, 14(4): 845–859. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02647.x>
- BOTÍAS, C ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; MEANA, A ; HIGES, M (2013) Screening alternative therapies to control Nosemosis type C in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Research in Veterinary Science*, 95(3): 1041–1045. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.012>

289 CHAUZAT, M - P ; CAUQUIL, L ; ROY, L ; FRANCO, S ; HENDRIKX, P ; RIBIÈRE-
 290 CHABERT, M (2013) Demographics of the European apicultural industry. *PloS*
 291 *One*, 8(11): e79018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079018>

292 CEPERO, A ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; PRIETO, L ; GÓMEZ-MORACHO, T ;
 293 MARTÍNEZ-SALVADOR, A ; BARTOLOMÉ, C ; MASIDE, X ; MEANA, A ; HIGES,
 294 M (2014a) Is *Acarapis woodi* a single species? A new PCR protocol to evaluate its
 295 prevalence. *Parasitology Research*, 114(2): 651–658.
 296 <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4229-6>

297 CEPERO, A ; RAVOET, J ; GÓMEZ-MORACHO, T ; BERNAL, J L ; DEL NOZAL, M J ;
 298 BARTOLOMÉ, C ; MASIDE, X ; MEANA, A ; GONZÁLEZ-PORTO, A V ; DE
 299 GRAAF, D C ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; HIGES, M (2014b) Holistic screening
 300 of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Research Notes*,
 301 7(1): 649. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-649>

302 DAINAT, B ; EVANS, J D ; CHEN, Y P ; GAUTHIER, L ; NEUMANN, P (2012)
 303 Predictive markers of honey bee colony collapse. *PloS One*, 7(2): e32151.
 304 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>

305 DESNEUX, N ; DECOURTYE, A ; DELPUECH, J - M (2007) The sublethal effects of
 306 pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81–106.
 307 <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

308 DUSSAUBAT, C ; BRUNET, J – L ; HIGES, M ; COLBOURNE, J K ; LOPEZ, J ; CHOI,
 309 J - H, MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; BOTÍAS, C ; COUSIN, M ; MCDONNELL, C ;
 310 BONNET, M ; BELZUNCES, L P ; MORITZ, R F A ; LE CONTE, Y ; ALAUX, C
 311 (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in
 312 the honey bee *Apis mellifera*. *PloS One*, 7(5): e37017.
 313 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037017>

314 DUSSAUBAT, C ; SAGASTUME, S ; GÓMEZ-MORACHO, T ; BOTÍAS, C ; GARCÍA-
 315 PALENCIA, P ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; LE CONTE, Y ; HIGES, M (2013a).
 316 Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different
 317 geographic origins. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4): 670–678.
 318 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.012>

319 DUSSAUBAT, C ; MAISONNASSE, A ; CRAUSER, D ; BESLAY, D ; COSTAGLIOLA,
 320 G ; SOUBEYRAND, S ; KRETZCHMAR, A ; LE CONTE, Y (2013b) Flight behavior
 321 and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee
 322 workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*,
 323 113(1): 42–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.01.002>

324 EVISON, S E F ; ROBERTS, K E ; LAURENSEN, L ; PIETRAVALLE, S ; HUI, J ;
 325 BIESMEIJER, J C ; SMITH, J E ; BUDGE, G ; HUGHES, W O H (2012)
 326 Pervasiveness of parasites in pollinators. *PloS One*, 7(1): e30641.
 327 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030641>

328 FRANCIS, R M ; NIELSEN, S L ; KRYGER, P (2013) Varroa-virus interaction in
 329 collapsing honey bee colonies. *PloS One*, 8(3): e57540.
 330 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>

331 GARRIDO-BAILÓN, E ; BARTOLOMÉ, C ; PRIETO, L ; BOTÍAS, C ; MARTÍNEZ-
 332 SALVADOR, A ; MEANA, A ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; HIGES, M (2012) The

- prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental Parasitology*, 132(4): 530–536.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.018>
- GOBLIRSCH, M ; HUANG, Z Y ; SPIVAK, M (2013) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PloS One*, 8(3): e58165. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>
- GÓMEZ-MORACHO, T ; MASIDE, X ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; HIGES, M ; BARTOLOMÉ, C (2013) High levels of genetic diversity in *Nosema ceranae* within *Apis mellifera* colonies. *Parasitology*, 141(4): 475–81.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013001790>
- HALL, T A (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> Accessed 24 June 2014
- HIGES, M ; GARCÍA-PALENCIA, P ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; MEANA, A (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 211–217.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>
- HIGES, M ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; BOTÍAS, C ; BAILÓN, E G ; GONZÁLEZ-PORTO, A V ; BARRIOS, L ; DEL NOZAL, M J ; BERNAL, J L ; JIMÉNEZ, J J ; GARCIA- PALENCIA, P ; MEANA, A (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10): 2659–69. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>
- HIGES, M ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; MARTÍNEZ-SALVADOR, A ; GARRIDO-BAILÓN, E ; GONZÁLEZ-PORTO, A V ; MEANA, A ; BERNAL, J L ; DEL NOZAL, M J ; BERNAL, J (2010) A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2): 243–250. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x>
- HIGES, M ; JUARRANZ, Á ; DIAS-ALMEIDA, J ; LUCENA, S ; BOTÍAS, C ; MEANA, A ; GARCIA – PALENCIA, P ; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R (2013) Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, 5(4): 530–6.
<http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12059>
- JOHNSON, R M ; ELLIS, M D ; MULLIN, C A ; FRAZIER, M (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41(3): 312–331.
<http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010018>
- LAMBERT, O ; PIROUX, M ; PUYO, S ; THORIN, C ; L'HOSTIS, M ; WIEST, L ; BULETÉ, A ; DELBAC, F ; POULIQUEN, H (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PloS One*, 8(6): e67007.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067007>
- LANGREDGE, D F ; MCGHEE, R B (1967) *Crithidia mellificae* n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*. *The Journal of Protozoology*, 14(3): 485–487. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>

376 MARTÍN-HERNÁNDEZ, R ; BOTÍAS, C ; BAILÓN, E G ; MARTÍNEZ-SALVADOR, A ;
377 PRIETO, L ; MEANA, A ; HIGES, M (2012) Microsporidia infecting *Apis mellifera*:
378 coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?
379 *Environmental Microbiology*, 14(8): 2127–2138. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-](http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x)
380 [2920.2011.02645.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x)

381 MCDONNELL, C M ; ALAUX, C ; PARRINELLO, H ; DESVIGNES, J – P ; CRAUSER,
382 D ; DURBESSON, E ; BESLAY, D ; LE CONTE, Y (2013) Ecto- and endoparasite
383 induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee
384 (*Apis mellifera*). *BMC Ecology*, 13(1): 25. [http://dx.doi.org/10.1186/1472-6785-13-](http://dx.doi.org/10.1186/1472-6785-13-25)
385 [25](http://dx.doi.org/10.1186/1472-6785-13-25)

386 MEEUS, I ; DE GRAAF, D C ; JANS, K ; SMAGGHE, G (2010) Multiplex PCR
387 detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees
388 using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1): 107–15.
389 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04635.x>

390 MEIXNER, M D ; FRANCIS, R M ; GAJDA, A ; KRYGER, P ; ANDONOV, S ;
391 UZUNOV, A ; TOPOLSKA, G ; COSTA, C ; AMIRI, E ; BERG, S ; BIENKOWSKA,
392 M ; BOUGA, M ; BÜCHLER, R ; DYRBA, W ; GURGULOVA, K ; HATJINA, F ;
393 IVANOVA, E ; JANES, M ; KEZIC, N ; KORPELA, S ; LE CONTE, Y ; PANASIUK,
394 B ; PECHHACKER, H ; TSOKTOURIDIS, G ; VACCARI, G ; WILDE, J (2014)
395 Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European
396 genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research*,
397 53(2): 215–219. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.04>

398 MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO (MARM): Anuario
399 de estadística 2006–2007. Capítulo 24; 2007. <http://goo.gl/7Q0eH> Accessed 24
400 June 2014

401 MULLIN, C A ; FRAZIER, M ; FRAZIER, J L ; ASHCRAFT, S ; SIMONDS, R ;
402 VANENGELSDORP, D ; PETTIS, J S (2010) High levels of miticides and
403 agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS*
404 *One*, 5(3): e9754. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>

405 OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES: OIE (2008) Manual of Standards for
406 Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.2.7. Varroosis of
407 Honey Bees.
408 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.07 VARROO](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.07_VARROO)
409 [SIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.07_VARROO) Accessed 9 March 2015

410 PERRY, C J ; SØVIK, E ; MYERSCOUGH, M R ; BARRON, A B (2015) Rapid
411 behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies.
412 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*
413 *America*, 201422089: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1422089112>

414 PETTIS, J S ; LICHTENBERG, E M ; ANDREE, M ; STITZINGER, J ; ROSE, R ;
415 VANENGELSDORP, D (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides
416 which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS One*,
417 8(7): e70182. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

418 POTTS, S G ; BIESMEIJER, J C ; KREMEN, C ; NEUMANN, P ; SCHWEIGER, O ;
419 KUNIN, W E (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends*

420 *in Ecology & Evolution*, 25(6): 345–353.
 421 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

422 RATNIEKS, F L W ; CARRECK, N L (2010) Ecology. Clarity on honey bee collapse?
 423 *Science (New York, N.Y.)*, 327: 152–153.
 424 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185563>

425 RAVOET, J ; MAHARRAMOV, J ; MEEUS, I ; DE SMET, L ; WENSELEERS, T ;
 426 SMAGGHE, G ; DE GRAAF, D C (2013) Comprehensive bee pathogen screening
 427 in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter
 428 mortality. *PloS One*, 8(8): e72443. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>

429 REAL DECRETO 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un
 430 Programa nacional de lucha y control de enfermedades de las abejas de la miel.
 431 Boletín Oficial del Estado 118, 17 de mayo de 2007.

432 ROSENKRANZ, P ; AUMEIER, P ; ZIEGELMANN, B (2010) Biology and control of
 433 *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S96–119.
 434 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

435 RUNCKEL, C ; FLENNIKEN, M L ; ENGEL, J C ; RUBY, J G ; GANEM, D ; ANDINO, R
 436 ; DERISI, J L (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four
 437 novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*.
 438 *PloS One*, 6(6): e20656. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>

439 STAVELEY, J P ; LAW, S A ; FAIRBROTHER, A ; MENZIE, C A (2014) A Causal
 440 Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). *Human*
 441 *and Ecological Risk Assessment*, 20(2): 566–591.
 442 <http://dx.doi.org/10.1080/10807039.2013.831263>

443 VAN DER ZEE, R ; PISA, L ; ANDONOV, S ; BRODSCHNEIDER, R ; CHARRIÈRE, J
 444 – D ; CHLEBO, R ; COFFEY, M F ; CRAILSHEIM, K ; DAHLE, B ; GAJDA, A ;
 445 GRAY, A ; DRAZIC, M M ; HIGES, M ; KAUKO, L ; KENCE, A ; KENCE, M ;
 446 KEZIC, N ; KIPRIJANOVSKA, H ; KRALJ, J ; KRISTIANSEN, P ; MARTÍN-
 447 HERNÁNDEZ, R ; MUTINELLI, F ; NGUYEN, B K ; OTTEN, C ; ÖZKIRIM, A ;
 448 PERNAL, S F ; PETERSON, M ; RAMSAY, G ; SANTRAC, V ; SOROKER, V ;
 449 TOPOLSKA, G ; UZUNOV, A ; VEJSNÆS, F ; WEI, S ; WILKINS, S (2012)
 450 Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey,
 451 for the winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research*,
 452 51(1):100–114. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12>

453 VANENGELSDORP, D ; EVANS, J D ; SAEGERMAN, C ; MULLIN, C ; HAUBRUGE, E
 454 ; NGUYEN, B K ; FRAZIER, M ; FRAZIER, J ; COX-FOSTER, D ; CHEN, Y ;
 455 UNDERWOOD, R ; TARPY, D R ; PETTIS, J S (2009) Colony collapse disorder: a
 456 descriptive study. *PloS One*, 4(8): e6481.
 457 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>

458 VANENGELSDORP, D ; MEIXNER, M D (2010) A historical review of managed honey
 459 bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect
 460 them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: S80–S95.
 461 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.011>

462 VILLA, J D ; BOURGEOIS, A L ; DANKA, R G (2013) Negative evidence for effects of
 463 genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of

464 *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie*, 44(5): 511–518.
 465 <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-013-0201-1>

466 WOLF, S ; MCMAHON, D P ; LIM, K S ; PULL, C D ; CLARK, S J ; PAXTON, R J ;
 467 OSBORNE, J L (2014) So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced
 468 homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PloS One*, 9(8): e103989.
 469 [http://dx.doi.org/ 10.1371/journal.pone.0103989](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103989)

470 YÁÑEZ, K P ; MARTÍN, M T ; BERNAL, J L ; NOZAL, M J ; BERNAL, J (2014) Trace
 471 Analysis of Seven Neonicotinoid Insecticides in Bee Pollen by Solid–Liquid
 472 Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass
 473 Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(2): 490–499.
 474 <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-013-9710-9>

475

476

477

478

479

Table 1: Apiary description and sampling. Colonies in Apiaries A1 to A5 had small adult bee populations (only a few hundred young bees) or empty hives with pollen, honey and brood, colony loss and no honey production in the previous harvest season. Colonies in Apiaries B1 to B5 were asymptomatic.

Apiary data	Sampling date	Honey bee colonies in apiary	Dead colonies (%)	Honey bee samples	Type of sample analyzed
Toledo A1	Summer 2013	300	70	A1-1	1 composite sample of 10 depopulated surviving colonies from the apiary. > 300 bees
Murcia A2	Spring 2013	172	90	A2-1;A2-2;A2-3;A2-4;A2-5;A2-6	6 samples from surviving colonies with clinical signs. > 300 bees/sample
Cuenca A3	Autumn 2013	870	80	A3-1; A3-2; A3-3	3 samples from surviving depopulated colonies. > 300 bees/sample
Cantabria A4	Autumn 2013	120	90	A4-1	1 composite sample from 8 depopulated surviving colonies. > 300 bees
Valencia A5	Spring 2013	500	90	A5-1; A5-2; A5-3; A5-4	4 samples from depopulated surviving colonies. > 300 bees/sample
Toledo B1	Summer 2013	100	2	B1	1 composite sample of 10 asymptomatic colonies. > 300 bees
Guadalajara B2	Spring 2013	150	3	B2	1 composite sample of 10 asymptomatic colonies. > 300 bees
Cuenca B3	Autumn 2013	250	5	B3	1 composite sample of 15 asymptomatic colonies. > 300bees
Asturias B4	Autumn 2013	150	8	B4	1 composite sample of 10 asymptomatic colonies. > 300 bees
Valencia B5	Spring 2013	300	10	B5	1 composite sample of 15 asymptomatic colonies. > 300bees

Table 2: Results obtained from samples of adult honey bees and bee bread. (+) Detected; (-) No detected.

Honey bee sample	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	<i>A. woodi</i>	Trypanosomatids	Trypanosomatids GenBank accession number	Neogregarines	<i>V. destructor</i>	Neonicotinoids
A1-1	+	-	+	+	KJ410355	-	-	-
A2-1	+	-	+	+	KJ410356	-	-	-
A2-2	+	+	+	-	-	-	-	-
A2-3	+	-	+	+	KJ410357	-	-	-
A2-4	+	-	-	+	KJ410358	-	-	-
A2-5	+	-	-	-	-	-	-	-
A2-6	+	-	+	+	KJ410359	-	-	-
A3-1	+	-	-	+	KJ410360	-	-	-
A3-2	+	-	-	+	KJ410352	-	-	-
A3-3	+	-	-	-	-	-	-	-
A4-1	+	-	-	-	-	-	+	-
A5-1	+	-	-	-	-	-	-	-
A5-2	+	-	-	+	KJ410361	-	-	-
A5-3	+	-	+	+	KJ410353	-	-	-
A5-4	+	-	+	+	KJ410354	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
B3	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	-	-	-	+	-
B5	+	-	-	-	-	-	+	-

Las abejas melíferas desarrollan una función biológica muy importante gracias a su acción polinizadora y a la producción de productos de utilidad para el ser humano. La determinación de su estado sanitario es de crucial importancia para establecer programas de conservación y protección de estos insectos. En este trabajo se han desarrollado un completo programa de monitorización que incluye actuaciones de vigilancia activa, mediante muestreos sistemáticos, y de vigilancia pasiva, mediante el análisis de muestras procedentes de colmenares con problemas patológicos o de controles rutinarios. La instauración de un programa como el que aquí se presenta resulta fundamental para detectar las fluctuaciones en la prevalencia de los patógenos conocidos, la detección precoz de agentes exóticos y la determinación de los niveles de contaminación en las colonias de abejas. Igualmente, el análisis de las relaciones entre todos los factores indicados permite determinar los agentes nosógenos asociados con las pérdidas de colmenas en nuestro país.